

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



| | | |
|--|-----------|--|
| <p>(51) 国際特許分類 A61K 39/35 // C07K 14/725</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO97/32600</p> <p>(43) 国際公開日 1997年9月12日(12.09.97)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00740</p> <p>(22) 国際出願日 1997年3月10日(10.03.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/80702 1996年3月10日(10.03.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治乳業株式会社(MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋2丁目3番6号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 曾根敏雄(SONE, Toshio)(JP/JP) 兪 晃智(KUME, Akinori)(JP/JP) 大力一雄(DAIRIKI, Kazuo)(JP/JP) 岩間亜希子(IWAMA, Akiko)(JP/JP) 紀 光助(KINO, Kohsuke)(JP/JP) 〒250 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社 ヘルスサイエンス研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志(SHIMIZU, Hatsushi) 〒300 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> | | <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> |
| <p>(54)Title: PEPTIDE-BASE IMMUNOTHERAPEUTIC AGENT FOR ALLERGIC DISEASES</p> <p>(54)発明の名称 アレルギー疾患に対するペプチド免疫療法剤</p> <p>(57) Abstract A peptide-base immunotherapeutic agent containing an efficacious amount of a monomolecular multi-epitope peptide prepared by bonding T-cell epitope regions derived from different allergen molecules with each other. It is efficacious for the prevention and therapy of a wide variety of allergic diseases.</p> | | |

(57) 要約

本発明は、異なるアレルゲン分子由来のT細胞エпитープ領域をつなぎ合わせた1分子の多重エピトープペプチドを提供するものである。この多重エピトープの有効量を含有するペプチド免疫療法剤は、広範囲のアレルギー疾患の予防及び治療に有効である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|----|-------------|----|-----------------------|----|----------|----|------------|
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LR | リベリア | RU | ロシア連邦 |
| AM | アルメニア | EG | エジプト | LS | レソト | RS | セルビア |
| AU | オーストラリア | FI | フィンランド | LT | リトアニア | SE | スウェーデン |
| AZ | アゼルバイジャン | FR | フランス | LU | ルクセンブルグ | SG | シンガポール |
| BB | バハマ | GB | グレートブリテン及び北アイルランド連合王国 | LV | ラトヴィア | SI | スロベニア |
| BE | ベルギー | GG | ガナ | MC | モナコ | SK | スロバキア |
| BF | ブルキナファソ | GH | ガーナ | MD | モルドバ | SN | セネガル |
| BG | ブルガリア | GN | ギニア | MG | マダガスカル | SS | ス威士ランド |
| BR | ブラジル | GU | グアテマラ | MK | マケドニア | TD | チュニジア |
| BS | バハマ | HE | ハンガリー | ML | マリ | TM | トルクメニスタン |
| BT | ブータン | IE | アイルランド | MR | モーリタニア | TT | トリニダード・トバゴ |
| BV | ブービヤ | IS | アイスランド | MN | モンゴル | TR | トルコ |
| CA | カナダ | IT | イタリア | MX | メキシコ | UA | ウクライナ |
| CC | ココス（キリング）諸島 | JP | 日本 | NE | ニジェール | UG | ウガンダ |
| CD | コンゴ民主共和国 | KE | ケニア | NL | オランダ | US | アメリカ合衆国 |
| CF | 中央アフリカ共和国 | KR | 大韓民国 | NO | ノルウェー | UZ | ウズベキスタン |
| CG | コンゴ共和国 | KZ | カザフスタン | NZ | ニュージーランド | VN | ベトナム |
| CH | スイス | KG | キルギス | PL | ポーランド | YU | ユーゴスラビア |
| CI | コートジボワール | KK | カメルーン | PT | ポルトガル | | |
| CK | クック諸島 | KL | クウェート | RO | ルーマニア | | |
| CM | カメルーン | LS | レソト | | | | |
| CN | 中国 | LI | リベリア | | | | |
| CO | コロンビア | LU | ルクセンブルグ | | | | |
| CR | コスタリカ | LV | ラトヴィア | | | | |
| CU | キューバ | MC | モナコ | | | | |
| CV | カーボベルデ | MD | モルドバ | | | | |
| CX | クリスマス島 | ME | モンテネグロ | | | | |
| CY | キプロス | MG | マダガスカル | | | | |
| CZ | チェコ | MH | マーシャル諸島 | | | | |
| DE | ドイツ | MI | ミクロネシア連邦 | | | | |
| DK | デンマーク | ML | マリ | | | | |

明細書

アレルギー疾患に対するペプチド免疫療法剤

技術分野

本発明は、アレルギー疾患に対するペプチド免疫療法に有効な多重エпитープペプチドに関する。

背景技術

アレルギー疾患は、I型過敏症(hypersensitivity)免疫反応、すなわち、IgE抗体を介したI型免疫反応が基盤となって生じた機能障害、あるいは障害による疾患群と定義される。その病態は、花粉症、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、アナフィラキシーショックなどである。花粉症は、アレルギー疾患の代表的疾患であり、我が国では、約10%の人達がスギ花粉症に苦しめられているが、なお、その数は増加の一途をたどっている。米国では、ブタクサ花粉症の患者が5~15%いると推測されている。このように花粉症は、その患者数が多いこと、眼のかゆみ、鼻水、くしゃみ、鼻づまり等のつらい症状を伴うこと、一度発病すると毎年繰り返すこと等から社会的、経済的にも大きな問題であり、根本的治療法の開発が切望されている。

I型アレルギー反応の成立に関する研究は、アレルギー疾患の理解と治療にあたって重要である。現在、アレルゲン特異的免疫反応における初期の反応、特に、T細胞によるアレルギー反応制御のメカニズムの解明に焦点が当てられている。アレルゲンを含む外来抗原に対する免疫反応の開始は、免疫システムの抗原提示細胞に依存する。B細胞、マクロファージ、および樹状細胞を含む抗原提示細胞は、外来抗原を取り込み、抗原ペプチド(T細胞エпитープペプチド)まで断片化してMHCクラスII分子(ヒトではHLAクラスII)の α 鎖および β 鎖で形成され

るポケットに收容し、細胞表面に表現し、抗原特異的CD4陽性ヘルパーT細胞(Th細胞)に抗原提示する。HLAクラスII分子はDR、DQおよびDP分子からなり、DR分子の α 鎖はHLA-DRA、 β 鎖はHLA-DRB1、-DRB3、-DRB4または-DRB5遺伝子によりコードされ、DQ分子の α 鎖は、HLA-DQA1、 β 鎖はHLA-DQB1遺伝子によりコードされ、DP分子の α 鎖はHLA-DPA1、 β 鎖はHLA-DPB1遺伝子によってコードされている。HLA-DRAを除く各々の遺伝子は多くの対立遺伝子を含み、抗原ペプチドを收容するポケットは高度の多型性を示し、その構造が微妙に異なる。その結果、ポケットに結合しT細胞に提示される抗原ペプチドの種類はおのずとその構造に制限される。

HLAクラスII拘束性の抗原情報をT細胞レセプター(TCR)を介して受け取ったTh細胞は、活性化し、種々のサイトカインを分泌することにより自ら増殖するとともに、B細胞を形質細胞に分化させ、抗体産生を誘導する。抗原刺激によって活性化されたTh細胞は、サイトカインの産生パターンの相違によってインターロイキン2(IL-2)、インターロイキン γ (IFN- γ)、リンボトキシン(TNF- β)を産生するTh1細胞、IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13を産生するTh2細胞、両方のサイトカインを産生するTh0細胞、に分類される。アレルギーの原因となるIgE抗体の産生は、IL-4、IL-13によって促進されるが、IFN- γ によって抑制される。すなわち、Th1細胞はIgEの産生を抑制し、Th2細胞はそれを促進する。抗原の侵入に際し、Th1細胞が働くかTh2細胞が働くかでアレルギーの感作が生じるか否かが定まるともいえる。実際、アレルギー患者ではTh2細胞が優位に働いていることが知られている。アレルギー特異的IgE抗体は、末梢血中の好塩基球および組織のマスト細胞に固着し、引き続くアレルギーの侵入により、アレルギーを介してIgE抗体が好塩基球やマスト細胞上で架橋し、その結果、ヒスタミン、プロスタグランジンおよびロイコトリエンを含む炎症性メディエーターが放出され、即時性アレルギー反応が引き起こされる。これらの炎症性メディエーターに応答して、局所に集積したリンパ

球、単球、好塩基球、および好酸球が活性化され、組織に障害を含む様々な反応をもたらすメディエーターを遊離することにより遅発アレルギー反応が引き起こされる。

抗原特異的に I g E 抗体産生を抑制することで特定のアレルギーを治療しようとする試みの一つに、アレルゲンタンパク分子を用いた減感作療法がある。減感作療法は、薬物療法では得ることの出来ない長期にわたる持続効果があり、唯一の根本的治療に近いにもかかわらず、かならずしも一般的な治療法として認知されていないのが現状である。その理由として、この治療法に伴う副作用（局所の腫脹やアナフィラキシーショックなど）の危険性のほかに、この治療法がどうしても有効なのかその作用機序がいまだに不明である点があげられる。

そこで登場したのが T 細胞エпитープを有するペプチド抗原を用いた減感作の考え方である。この治療方法に用いられるアレルゲン分子上の T 細胞エпитープを含むペプチド断片は、B 細胞エпитープを含まない、あるいは含んでいても 1 価であり、マスト細胞の高親和性 I g E レセプターをクロスリンクできない、などの理由により、患者に投与してもアナフィラキシーなどの副作用がおこらないと考えられる。さらに、T 細胞エпитープを生体に投与すると、T 細胞が抗原特異的に不活性化（アナジー、anergy）される現象が知られている (La Salle JM, et al.: J. Exp. Med. 176: 177-186, 1992)。このような理論的背景のもとにネコの毛アレルゲン Fel d 1 の主要 T 細胞エпитープを含むペプチドを用いた減感作の動物実験が行われ、in vitro で T 細胞アナジーが誘導されることが報告されており (Briner, T. J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7608-7612, 1994)、現在このペプチドを用いた減感作の臨床試験が行われている (Norman, P. S. et al.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 154: 1623-1628, 1996; Simons, F. E. et al.: Int. Immunol. 8: 1937-1945, 1996)。このようなアレルゲン分子上の主要 T 細胞エпитープを含むペプチドを用いた減感作療法は「Peptide-based Immunotherapy」（ペプチド免疫療法あるいはペプチド減感作療法）と呼ばれて

いる。

ペプチド免疫療法に用いるT細胞エпитープペプチドの選定基準として、重要度指数 (Positivity Index; 平均T細胞刺激係数×出現頻度) が考案されている (国際公開第94/01560号)。また、ペプチドデザインに際して患者集団におけるHLAハプロタイプの多様性をカバーすべきであるとの報告がある (Wallrer, B. P. & Geftter M. L.: Allergy, 49: 302-308, 1994)。

発明の開示

アレルギー患者の中には異なる2種類以上のアレルゲン分子のそれぞれに特異的IgE抗体を持っている者が多い。このような患者にも有効なペプチド免疫療法剤を開発することはアレルギーの根本治療に必要である。しかしながらこれまでにこのような免疫療法剤は開発されてはおらず、上記文献にもこのような発想は示されていない。従って、本発明は、異なる2種以上のアレルゲンに感受性のアレルギー患者にも有効なペプチド免疫療法剤を提供することを課題とする。

スギ花粉主要アレルゲンには、Cry j 1 (Yasueda, H. et al.: J. Allergy Clin. Immunol. 71:77-86, 1983) 及び Cry j 2 (Taniai, M. et al.: FEBS Letter 239: 329-332, 1988; Sakaguchi, M. et al.: Allergy. 45: 309-312, 1990) があるが、スギ花粉症患者の90%以上はCry j 1とCry j 2それぞれに対する特異的なIgE抗体をもっており、残り10%弱の患者は、Cry j 1又はCry j 2のどちらか一方に対する特異的IgE抗体をもっている (Hashimoto, M. et al.: Clin. Exp. Allergy 25:848-852, 1995)。従って、本発明者らは、スギ花粉症に対するペプチド免疫療法にCry j 1のみ、或いはCry j 2のみのT細胞エпитープを用いた場合には、患者の90%に対して十分な有効性は期待できないと考え、Cry j 1のT細胞エпитープ及びCry j 2のT細胞エпитープを同一分子内に含む多重エпитープを作製した。そして、当該多重エпитープペプチドがin vitroにおいて、花粉症患者のT細胞を活性化し、かつ当該患者のIgE抗体と反応せず、マウスを用いたin vivoに

においても免疫応答を誘導することを見出し、この新規な知見から、当該多重エпитープペプチドがスギ花粉症患者に対するペプチド免疫療法剤として有効であることが判明した。

更に、本発明者らはこの考え方を進展させて、スギ花粉症の症例では、ヒノキ花粉に対しても臨床症状を発現する例が多いことから、ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1のT細胞エпитープ（特願平8-153527号）とスギ花粉アレルゲンCry j 1のT細胞エпитープとを同一分子内に含む多重エпитープを作製し、当該多重エпитープペプチドが、それぞれのT細胞エпитープには反応しないスギ花粉症患者及びヒノキ花粉症患者のT細胞を活性化することを見出した。これらの新規な知見に基づき、このような多重エпитープのデザインは、スギ花粉アレルゲン及びヒノキ花粉アレルゲンに限定されず他のさまざまなアレルゲン由来のT細胞エпитープに適用できることが判明した。

さらにまた、より多くの患者に効果が期待されるように、多重エпитープをデザインする際のT細胞エпитープの選定基準として、患者集団（民族も含めて）におけるHLAハプロタイプを調査し、母集団におけるHLAハプロタイプの出現頻度が高いHLAに結合するエпитープをなるべく選択するように配慮すると共に、各エпитープがなるべく同一のHLAクラスII分子によって抗原提示されるものではなく、異なったタイプのHLAクラスII分子によって抗原提示されるT細胞エпитープペプチドを選定することにより、さらに有効対象患者を拡大させることを明らかにした。

すなわち、本発明は、請求の範囲の各請求項に記載の発明からなる。

以下に本発明をスギ花粉、或いはヒノキ花粉に感受性の患者、またはその双方に感受性の患者に有効な多重エпитープペプチドのデザインについて説明するが、本発明はこれらのアレルゲンに感受性の患者のみに限定されない。例えば、すでに一次構造が明らかにされている他のアレルゲン、例えば、ブタクサ（Amb a 1, Amb a 2, Amb a 5, Amb t 5, Amb p 5）、カモガヤ（Dac g 2）、ホソム

ギ (Lol p1, Lol p2, Lol p3) などの草木花粉、ハンノキ (Aln g1)、カバ (Bet v1, Bet v2)、マウンテンセダー (Jun s1)、エンビツビャクシン (Jun v1) などの樹木花粉、或いはその他ここに記載しないさまざまなアレルゲンにも本発明の技術思想は適用され得る。

本明細書において、「多重エпитープペプチド」とは、異なるアレルゲン分子由来のT細胞エпитープが含まれているペプチド（抗原ペプチド又は単にペプチドともいう）を直鎖状に連結して1分子としたペプチドを意味する。また、T細胞エпитープを含むペプチド領域の間に、新たに認識されるエпитープ部位が生じる可能性を減少させるために、生体内で切断される領域を介在させることが好ましい。結果として、該切断領域で多重エпитープペプチドが個々の抗原ペプチドに切断されるので、個別の抗原ペプチドを混合物として投与した場合と同等の効果が期待される。なお、該切断領域は、生体内で切断を受ける限りはいかなる構造でもよいが、ライソゾームに含まれる酵素であるカテプシンBの認識配列であるアルギニンダイマーまたはリシンダイマーを用いることができる。

本発明の多重エпитープペプチドデザインについて、スギ花粉アレルゲンCry j 1およびCry j 2を例として説明する。

スギ花粉症患者末梢血リンパ球をCry j 1またはCry j 2で刺激し、患者ごとのT細胞ラインを作製する。Cry j 1(国際公開第94/01560号)またはCry j 2(Komiyama, N. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 201: 1201, 1994)の全一次構造をカバーする15アミノ酸程度のオーバーラッピングペプチドでT細胞ラインを刺激することにより、Cry j 1またはCry j 2分子上でT細胞エпитープとして認識されるアミノ酸配列を同定する(図1、図2)。

次に、これら抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子をタイピングする。

ヒトの場合、HLAクラスII分子の遺伝子座には、DR、DQ及びDP分子が存在することが知られている。このことは、抗原を提示する抗原提示分子DR、DQ及びDPによりT細胞の分化が規定されている可能性を意味している。そのため、Cry j 1また

はCry j 2の抗原ペプチドがどの遺伝子座由来の抗原提示分子で提示されるのか、また、DR、DQ、またはDP分子を介して抗原ペプチド情報を受け取ったT細胞は、Th1またはTh2細胞のどちらに分化しやすい傾向にあるのかを患者毎に樹立したT細胞クローンを用いて決定する（図3、4）。

図3、4から、抗原ペプチドの刺激後のTh1、Th2またはTh0への分化は特定のエピトープ、特定のHLA分子の組み合わせでは規定されていないことが明らかである。すなわち、本発明の多重エピトープペプチドのデザインのためにペプチドを選定する場合には、最低限T細胞エピトープ部位を含むペプチドであれば、T細胞を刺激することができるため、抗原ペプチド選定の候補となり得る。

多重エピトープペプチドデザインのためのペプチドを選定する基準は、（1）まず重要度指数（国際公開第94/01560号）の高い順番にペプチドを選定する（但し重要度指数は約100以上のものを選定する）、（2）出現頻度の高いHLAクラスII分子を抗原提示分子としているペプチドを選定する、（3）重要度指数にあまり差がない場合、有効性を上昇させるために、異なったタイプの拘束分子で提示されるペプチドを選定することである。つまりあるアレルギー疾患に対する当該アレルゲンのT細胞エピトープを選択するとき、ある集団のアレルギー患者のHLAハプロタイプの解析を行ない、かつその患者集団が属する母集団の当該HLAハプロタイプの遺伝子頻度の高いT細胞エピトープを選択するのが最も効果が期待される選択である。逆の言い方をすれば、このようにして選択したT細胞エピトープは他の集団では全く有効性が認められなくなる場合があることを意味している。

例えば HLA ハプロタイプのDPB1*0501を例にすると、あるアレルギー疾患で日本人患者がこの HLA ハプロタイプが高頻度で認められ、この HLA ハプロタイプ拘束性のT細胞エピトープを選択したとする。一方こうして選択したペプチドは北アメリカ人で同じアレルギー疾患の患者に有効性はほとんど期待されない。なぜなら、この HLA ハプロタイプは日本人集団での遺伝子頻度が39.0%と非常に高

いが、北アメリカでの白人集団で1.3%、黒人集団で0.8%と非常に低いからである。北アメリカ人から HLA-DP 拘束性のT細胞エピトープを選択するなら DPB1*0401 (北アメリカ; 白人30.2%、黒人11.1%、日本人; 4.8%) 等を選択すべきである。さらに、抗原提示分子がDR、DQ、DPというように異なる遺伝子座レベル、または遺伝子座が同一でも異なったハプロタイプの抗原提示分子で提示されるペプチドを選定することが重要である。

この際、選定すべきエピトープ部位にシステイン残基が含まれていないことが好ましい。システイン残基がエピトープ部位に含まれていると、HLAクラスII分子に非特異的に結合する可能性があり、システイン残基を含む抗原ペプチドで免疫すると、本来は抗原ではない部位が、新たなエピトープとして認識される可能性がある。エピトープとして認識された場合には、2回目、3回目のペプチド投与により、システインを含むエピトープが認識され、副作用が現れる危険性が高くなると予測される。

以下、多重エピトープデザインの具体例を示す。図1と図2に示したCry j 1とCry j 2の重要度指数を用いると、Cry j 1におけるT細胞エピトープの重要度指数は、ペプチド番号43番のアミノ酸番号211-225 (以下p211-225と表示する) (拘束分子 DPA1*0101 - DPB1*0501) が一番高く、ペプチド番号22番p106-120 (拘束分子 DRB5*0101) が2番目である。この2者は多重エピトープペプチドに使用する抗原ペプチドとして選定できる。また、Cry j 2における重要度指数は、ペプチド番号14番p66-80 (拘束分子 DRB5*0101) と38番p186-190 (DRB4*0101) が高く同様に抗原ペプチドとして選定できる。Cry j 2のペプチド番号38番の前に位置するペプチド番号37番p181-195は、重要度指数が280であるが拘束分子がDPA1*0101 - DPB1*0201であり、38番の拘束分子とは異なる。ペプチド37番p181-195はペプチド番号38番p186-200と10残基オーバーラップしており、38番の前に37番の5残基を付加し、HLA-DP分子拘束性のペプチドとして選択できる。これまで選定してきたペプチドの中にはDQ拘束性を示す抗原ペプチドは存在しない。Cry j 1のペプチド番号

4番p16-30はDQA1*0102-DQB1*0602が拘束分子であるが、エピトープの中央にシステイン残基が含まれるため選定できない。Cry j 2のペプチド番号69～70番に該当するp341-360はDQA1*0102-DQB1*0602 で提示されるペプチドであるが、これも70番のペプチドの中にはシステインが含まれている。しかし、システインを含まない69番のペプチドのみでもT細胞を活性化することができるため、12残基のみ、即ちp344-355 (ISLKLTSKGKIAS) を選定できる。また、Cry j 1のペプチド番号22番p106-120は107番目にシステインを含むが、T細胞クローンを使用したT細胞エピトープのコア配列の決定によって最低必要な配列はp109-117 (FIKRVSNVI) の9残基である。すなわち、p106-107番目のPro-Cys残基を除去しても使用することができる。

抗原提示細胞内に取り込まれた抗原はライソゾームで分解される。抗原提示分子に外来性の蛋白質が取り込まれ、どのようにプロセスされ、またどのように HLAクラスII分子に結合するかは未だに未解決のままである。しかしながら、現在では、この複雑な機構の中で抗原の切断にカテプシンBが関与している可能性が指摘されている(勝沼信彦、日本免疫学会(1995)25:75)。

幾つかの HLAクラスIIタイプに関しては、抗原ペプチドのHLA結合性アミノ酸モチーフが決定されてきている。HLAクラスII分子に対する結合は特異性を有するが、ある特定のHLAクラスIIタイプについても一定の法則を満たすペプチドであればかなりの種類の抗原ペプチドが結合できる(Rammensee, H.-G. et al. Immunogenetics. (1995) 41:178-228)。このため、抗原ペプチドをつなげた部位に、新たに認識されるエピトープ部位が生ずる可能性がある。これを避けるため、抗原ペプチドごとに抗原提示細胞内で切断されるように多重エピトープペプチドをデザインするのが好ましい。カテプシンBが認識するペプチド配列はArg-Arg-疎水性配列またはLys-Lys-疎水性配列であるため、エピトープを含むペプチドの後半にArg-ArgまたはLys-Lysを付加し、次に続くエピトープ配列は Arg-ArgまたはLys-Lysに続いて疎水性アミノ酸配列が位置するように配置する。

この具体例の抗原ペプチドの配列の順番に関しては、抗原ペプチドの間にArg-Argを介在させたので、順番は問う必要がないと考えられるが、Cry j 2のペプチド番号14番（図2）に関しては、このペプチドの後半にArgを接続すると、73番のTyrが第一アンカーとなり、付加したArg残基がDRB5*0101のペプチド結合モチーフの9番目のアミノ酸となって第二アンカーとなる可能性がある。その結果、新たなエпитープとして認識される可能性がある。このため、この配列は多重エпитープペプチドの最後に位置するのが好ましい。

このようにして得られた多重エпитープペプチドを、配列番号：1に示す。この多重エпитープの拘束分子は、DRB4*0101、DRB5*0101、DPA1*0101-DPB1*0201、DPA1*0101-DPB1*0501、DQA1*0102-DQB1*0602である。第11回国際組織適合抗原会議において日本人集団におけるこれらの遺伝子頻度が計算されている（Tsuji, K. et al. HLA 1991 vol. 1 (1992) Oxford University Press）。DRB4*0101は0.291、DRB5*0101は0.056（DRB5*0102は0.070）、DPB1*0201は0.208、DPB1*0501は0.399、DQB1*0602は0.053（DQB1*0601は0.204）と算出されている。この値から抗原頻度を計算するとDRB4*0101=0.50、DRB5*0101=0.11（DRB5*0102=0.14）、DPB1*0201=0.37、DPB1*0501=0.64（Hori et al.の観察では0.79）、DQB1*0602=0.10（DQB1*0601=0.37）と計算される。DRB5*0101とDQB1*0602には連鎖不平衡が存在するため同一とみなせるため、DRB5*0101の値が使用できる。日本人集団でDPB1*0201とDPB1*0501の両タイプの両者または片方を所持する確率は0.85と計算される。また、DRB4*0101とDRB5*0101の両者または片方を所持する確率は0.56と計算される。この値から、配列番号：1の多重エпитープペプチドに含まれるT細胞エпитープを一箇所以上認識できる患者はおおよそ90%と見積もられる。しかしながら、これらのHLA-タイプを所持する患者においてもT細胞側でこれらの拘束分子で抗原情報が提示されてもこれらのエпитープペプチドを認識できるT細胞レパートリーが存在するかどうかは不明である。また、T細胞の増殖を引き起こすためのエпитープ数が未知である（2箇所以上必要である可能性がある）ため、この多重エピ

ープペプチドの有効率は下がると考えられる。実際には17名の末梢血リンパ球の増殖応答での結果つまり、77%前後が妥当な値と予測される。

さらに、有効対象人員を拡大させるために、T細胞エпитープをより多く含む多重エпитープペプチドをデザインすることもできる。例えば、Cry j 1のp213-225, p108-120, Cry j 2のp182-200, p79-98, Cry j 1のp80-95, Cry j 1のp66-80をこの順につないだ多重エпитープペプチド(配列番号: 2)、あるいは、Cry j 1のp213-225, p108-120, Cry j 2のp182-200, p79-98, Cry j 1のp67-95, Cry j 2のp238-251, p66-80をこの順につないだ多重エпитープペプチド(配列番号: 3)である。これらの多重エпитープペプチドは、調査したスギ花粉症患者21名全員の末梢血リンパ球を刺激し、患者IgE抗体と反応しないのでペプチド免疫療法剤として有効である。このような考え方をさらに進展させて、種の異なるアレルゲン例えば、ヒノキ花粉アレルゲンとスギ花粉アレルゲンのT細胞エпитープを実施例13に示す方法で作製し有効性の拡大をさらにはかることもできる。

T細胞の活性を調節するために多重エпитープペプチドに使用する抗原ペプチド部分の改変を行なうことも本発明に含まれる。改変とは1残基以上のアミノ酸置換、欠失、挿入を行なうことである。抗原ペプチドのアミノ酸置換によってT細胞に与える質的な変化を調べることは既に知られている方法で行うことができる。例えば、本発明の多重エпитープペプチド中の特定のアミノ酸を、1) 類似したアミノ酸に置換する方法で、Asp を Glu に、Asn を Gln に、Lys を Arg に、Phe を Tyr に、Ile を Leu に、Gly を Ala に、Thr を Ser に置換したアナログペプチドを合成し、T細胞の増殖能、あるいはリンホカインの産生能等をもとのペプチドと比較する、2) 類似していないアミノ酸に置換する方法で、極性アミノ酸と親水性アミノ酸は疎水性アミノ酸である Ala に、疎水性アミノ酸は親水性アミノ酸である Ser に置換し、もとのペプチドと比較する。このようにして得られたアナログペプチドで、本発明の多重エпитープペプチドと免疫学的に等価(重要度指数、T細胞活性化能等)な多重エпитープペプチドも、本発明に包含さ

れる。

Cry j 1 あるいは Cry j 2 由来の抗原ペプチドと反応する T 細胞は Th2 と Th0 の性質を有するものが多い (図3、図4)。ところで、BCGワクチンは細胞性免疫能を賦活することによって結核菌からの感染を予防する。細胞性免疫を賦活させるためには Th1 タイプの T 細胞を誘導しなければならないが、BCG接種したヒトの T 細胞クローンの性質を検討すると Th1 タイプの T 細胞が多いことが報告されている (松下 祥、第45回日本アレルギー学会、836頁、1995年)。松下の報告によれば、HLA-DR14(DRB1*1405) 拘束性に結核菌 BCGa 蛋白の84-100 アミノ酸配列 (EEYLILSARDVLAVVSK) を認識する Th1 クローンが存在する。そこで、日本人の60%以上が持っている HLAハプロタイプである DPA1-DPB1*0501 拘束性の T 細胞エпитープを選択し (例えば図1の Cry j 1 43番ペプチド (p211-225) / KSMKVTVAFNQFGPN)、このペプチドを DRB1*1405 拘束性の結核菌 BCGa 蛋白の84-100 T 細胞エпитープとつないだ多重エпитープペプチド EEYLILSARDVLAVVSKRRMKVTVAFNQFGPN は、DRB1*1405 のハプロタイプを持つスギ花粉症患者に当たる確率はかなり高くなると考えられる。このような多重エпитープペプチドを用いれば、BCGa 抗原由来ペプチドによって Th1 のリンホカイン、特に IL-12 の産生が期待できる。IL-12はIL-4 と相反する作用を持ち、T細胞にはたらいて Th細胞の Th1 への分化を誘導することが多くのヒトおよびマウスの例で知られている (Manetti, R., et al.: J. Exp. Med., 177, 1199-1204, 1993; Wu, C., et al.: J. Immunol., 151, 1938-1949, 1993; Hsieh, C., et al.: Science, 260, 547-549, 1993)。特に、Manetti 等の実験結果ではダニアレルゲンの一つである Der p 1 抗原特異的な T 細胞クローンは通常 Th2 が誘導されるが、IL-12 存在下では Th1 又は Th0 が誘導されるとされている。従って、Th1 誘導能を持つ T 細胞エпитープとアレルギー反応性の T 細胞エпитープを組み合わせた多重エпитープペプチドを用いることによって、本来 Th2 誘導性の T 細胞が Th1 又は Th0 タイプの T 細胞に誘導されることが期待される。

本発明のCry j 1及び／又はCry j 2のT細胞エпитープを少なくとも一つ含むペプチドをマウスに皮下投与するとその後のスギ花粉アレルゲンに暴露された場合にT細胞アナジーが生じ（図13、14）、IL-2産生量も対照群に比較して有意に低下する。ヒトの減感作療法の際はIL-2が減少するとの報告(J. Allergy Clin. Immunol. 76: 188, 1985)がある。さらに、本発明の多重エпитープペプチドは、当該ペプチドを構成する各T細胞エпитープペプチドに対するT細胞クローンのそれぞれを活性化し（図10）、かつ患者IgE抗体と反応しない（図8）。これらの結果は、本発明の多重エпитープペプチドがアレルゲンに対して免疫寛容を誘導し、アレルギー疾患のペプチド免疫療法剤としての有用性を示すものである。本発明多重エпитープペプチドは製薬学的に許容し得る担体または希釈剤と共に投与することができる。その有効量は、スギ花粉アレルゲンに対する感受性の程度、年齢、性別及び患者の体重、並びに患者における免疫応答を引き出すペプチドの能力などの因子に従って変化する。

投与経路は、注射（皮下、静脈内）、点鼻、点眼、経口、吸入、経皮などの簡便な方法で投与することができる。

なお、本明細書及び配列表におけるアミノ酸の1文字記号による表記は、IUPAC生化学命名委員会によって制定された表記とする（生化学辞典（第2版）146、8頁表1.1参照）。

図面の簡単な説明

図1は、スギ花粉症患者由来の細胞ラインのCry j 1オーバーラップペプチドに対する、平均刺激係数、出現頻度及び重要度指数（平均刺激係数×出現頻度）を示す図である。

図2は、スギ花粉症患者由来の細胞ラインのCry j 2オーバーラップペプチドに対する、平均刺激係数、出現頻度及び重要度指数（平均刺激係数×出現頻度）を示す図である。

図3は、Cry j 1の抗原ペプチドを拘束するHLAクラスIIタイプ及び当該抗原ペプチドとHLAクラスII拘束分子の複合体を認識するT細胞クローンのThタイプを示す図である。

図4は、Cry j 2の抗原ペプチドを拘束するHLAクラスIIタイプ及び当該抗原ペプチドとHLAクラスII拘束分子の複合体を認識するT細胞クローンのThタイプを示す図である。

図5は、抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子の遺伝子座レベル(DR、DQ、DP)における同定結果を示す図である。

図6は、抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子の各遺伝子座の対立遺伝子レベルにおける同定結果を示す図である。

図7は、多重エпитープペプチドに用いた抗原ペプチド結合配列を示す図である。図中a及びbはCry j 1のNo.43及び22のペプチドに対応し、cはCry j 2のNo.14に対応し、d、eは、No.37-38 (p181-200)、No.69-71 (p346-365) に対応する。

図8は、多重エпитープペプチド、C.A.#1、C.A.#2、C.A.#3、C.A.#4、C.A.#5、C.A.#6のヒトIgEとの反応性を示す図である。

図9は、T細胞クローンによる多重エпитープペプチド、C.A.#4に含まれるT細胞エпитープの認識結果を示す図である。

図10は、スギ花粉症患者と健常者の末梢血リンパ球に対する各種濃度の多重エпитープペプチド（配列番号：1）刺激によるリンパ球増殖応答能を示す図である。

図11は、2名の健常者と17名のスギ花粉症患者の末梢血リンパ球に対する配列番号：1の多重エпитープペプチド刺激による増殖応答能を示す図である。

図12は、CB6F1マウスに対するスギ花粉アレルゲンCry j 1投与による免疫寛容の誘導を示す図である。

図13は、CB6F1マウスに対するCry j 2のNo.14ペプチド（p66-80）投与による免疫寛容を示す図である。

図14は、CB6F1マウスに対するCry j 2のNo.48ペプチド (p236-250) 投与による免疫寛容を示す図である。

図15は、Cry j 1のNo.22ペプチド (p106-120) のコアアミノ酸配列決定を示す図である。

図16は、スギ花粉特異的T細胞エпитープペプチドとヒノキ花粉特異的T細胞エпитープペプチドからなる多重エпитープペプチドに対するスギ花粉症患者及びヒノキ花粉症患者のリンパ球の反応性を示す図である。

図17は、Cry j 1#22coreペプチドのアミノ酸置換アナログペプチドに対するT細胞クローンPJ7-9の増殖応答性およびその際のサイトカイン産生量を示す図である。

図18は、同上アナログペプチドに対するT細胞クローンPB10-18の増殖応答性およびその後のサイトカインの産生量を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 T細胞ラインを用いたCry j 1及びCry j 2のT細胞エпитープの同定

18名のスギ花粉症患者末梢血リンパ球を、スギ花粉アレルゲンであるCry j 1またはCry j 2で刺激して、各アレルゲンを特異的に認識するT細胞ラインを患者別に樹立した。

96-ウェル平板培養プレート上で、マイトマイシンC処理した 5×10^4 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 2×10^4 個のT細胞ラインを、0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込み量を測定した。ペプチドを添加した際の $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みの値を、ペプチドを添加しない対照 $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込み量の値で割ることによって得られる値 (刺激係数/Stimulation Index) が2以上である場合を、添加し

たペプチドが抗原ペプチドとして認識されたと定義する。

Cry j 1の場合、各患者が認識するCry j 1分子上のT細胞エпитープ部位は、平均9.8でありその範囲は $4 \leq \text{エピトープ数} \leq 15$ であった。他方、Cry j 2の場合は平均8.7であり、その範囲は $2 \leq \text{エピトープ数} \leq 13$ であった。Cry j 1は、353アミノ酸、Cry j 2は379アミノ酸で構成されるため、100アミノ酸残基あたりおよそ2.3~2.8箇所のT細胞エピトープ部位が存在することになる。

HLA-クラスIIタイプは、患者ごとに異なると考えられるため、認識されるT細胞エピトープは、HLA-クラスIIタイプごとに異なると予測される。そのため、各患者が認識する抗原ペプチドを患者ごとにマップした。その結果、Cry j 1、Cry j 2分子上では、各患者で認識され得るエピトープ部位は異なっていた。アレルゲン分子上では、個人によってT細胞エピトープとして認識され易い部位と認識されにくい部位が存在する。また、T細胞エピトープごとにT細胞の増殖率が異なるため、このエピトープマップのみでは、多重エピトープのデザインにどの抗原ペプチドを選定してよいのかの判定ができない。そこで、18名の患者について、刺激係数が2以上である場合の抗原ペプチドについて平均の刺激係数を算出し、この値に当該抗原ペプチドを保持する患者の割合（出現頻度）をかけることによって、エピトープごとの優位性を示す「重要度指数」を算出した（国際公開第94/01560号参照）。

図1と図2にその結果を示す。Cry j 1においては、ペプチド番号43番（p211-225）が重要度指数が679で最高値を示し、ペプチド番号22番の指数は578、ペプチド番号4番の指数は373と続いている。Cry j 2においては、ペプチド番号14番の指数が709で最高値を示し、ペプチド番号38番の指数が680、ペプチド番号48の指数が370と続いている。ペプチド免疫療法を考慮した場合には、重要度指数の高い抗原ペプチド一つを選定しペプチド免疫療法として使用する方法があるが、出現頻度の最も高い場合でも72%の患者でしか効果が期待できず、実際の有効率はさらに下がるであろう。有効率を上げるためにはいくつかのT細胞エピトープを組み合

わせる必要性がある。この場合、T細胞エピトープの選定には、重要度指数の高いものが候補となるが、いくら重要度指数の高いエピトープのみを選択しても、これらのエピトープを抗原として提示するHLAクラスII分子が同一であれば有効率を上げることはできない。そのため、T細胞エピトープペプチドを提示するHLAクラスII分子のタイプを同定する必要がある。

実施例2 T細胞クローンの認識するT細胞エピトープペプチドの同定

18名のスギ花粉症患者の中でCry j 1において高い重要度指数を示すペプチド番号43番と22番を認識する患者2名〔患者B（以下PBと略す）、患者J（PJ）〕とCry j 2において高い重要度指数を示すペプチド番号14番、38番、48番、69番を認識する患者3名〔PB、患者C（PC）、患者R（PR）〕を選定しこれらのスギ花粉症患者の末梢血リンパ球をCry j 1またはCry j 2で刺激してCry j 1またはCry j 2を認識するT細胞クローンを樹立した。4名の患者のHLA-クラスIとクラスIIタイプを以下に示す。

PB : A2/24 - B39/55 - Cw7/w3 - DRB1*1501/0901 - DRB4*0101 - DRB5*0101、DQA1*0102/0301 - DQB1*0602/0303 - DPA1*0101/0101 - DPB1*0501/0201、

PJ : A24/- - B61/51 - Cw3/- - DRB1*1501/0802 - DRB5*0101、DQA1*0102/0401 - DQB1*0602/0402 - DPA1*-/- - DPB1*0501/0402、

PC : A-2/2 - B54/51 - Cw1/-、DRB1*0405/1501 - DRB4*0101 - DRB5*0101 - DQA1*0301/0102 - DQB1*0401/0602 - DPA1*0202/0202 - DPB1*0201/0501、

PR : A-11/- - B60/35 - Cw7/w3 - DRB1*0901/1501 - DRB4*0101 - DRB5*0101 - DQA1*0301/0102 - DQB1*0303/0602 - DPA1*01/0202 - DPB1*0201/0201)。

Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計35種類、PJ由来末梢血リンパ球から計14種類樹立した。同様に、Cry j 2を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計31種類、PC由来末梢血リンパ球から10種類、PR由来末梢血リンパ球から17種類樹立した。これらのT細胞クローンは全てCD3⁺、CD4⁺、CD8⁻、TCR $\alpha\beta$ ⁺、TCR $\gamma\delta$ ⁻であるため、拘束分子はHL

A-クラスII分子であることが判明した。96-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した 5×10^4 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド及び 2×10^4 個のT細胞クローンを 0.2 ml の15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。この操作で、各T細胞クローンの認識するT細胞エпитープを同定した。

作製したCry j 1を認識するT細胞クローンの中で69% (34/49) は抗原を含むペプチド刺激に対して増殖応答を示し、抗原ペプチドを同定できた。同様に、Cry j 2を認識するT細胞クローンの中で、69% (40/58) において抗原ペプチドを同定できた。Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンは、ペプチド番号4、13、19、22、30、31、39、43、51、66番、Cry j 2を特異的に認識するT細胞クローンは、ペプチド番号4、8、14、17、31、37、38、48、65、66、68、69、70番を認識していた。結果を図3と図4にまとめた。

実施例3 遺伝子座レベルにおけるHLAクラスII拘束分子の同定

実施例2で樹立したT細胞クローンの増殖応答系に、HLA-クラスIIの DR、DQ、またはDPに対して特異的に反応する単クローン抗体を添加して、T細胞の増殖応答を阻止することにより、遺伝子座レベルでのHLAクラスII拘束分子を同定した。

96-ウェルマイクロ培養プレート上で、マイトマイシンC処理した 2×10^4 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗 DR、DQ、またはDP単クローン抗体（ベクトン/ディッキンソン社製）、 2×10^4 個のT細胞クローンを、 0.2 ml の15%血清を含むRPMI-1640 培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。結果を図5に示す。この図から、Cry j 1 p106-120、Cry j 2 p66-80、Cry j 2 p186-200ペプチドの拘束分子はDR、Cry j 2 p341-355 ペプ

チドの拘束分子はDQ、Cry j 1 p211-225、Cry j 2 p181-195の拘束分子はDPであることがわかる。他のT細胞クローンの拘束分子についても同様に解析した（図3及び図4参照）。

実施例4 HLAクラスII分子の個々のタイプにおける拘束分子の同定

HLAクラスII遺伝子座レベルでの拘束分子が同定できたT細胞クローンを、DRに関しては、個々のタイプを遺伝子導入したマウスL-細胞、DQまたはDPに関しては、タイプに関してハプロタイプの一致するB細胞株を抗原提示細胞として用いることにより個々のタイプにおける拘束分子の同定が可能である。

96-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した 5×10^4 個のマウスL-細胞、またはハプロタイプの一致するB細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗DR、DQ、またはDP単クローン抗体（ベクトン/ディッキンソン社製）、 2×10^4 個のT細胞クローンを0.2 mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。

T細胞クローンの増殖応答が観察された場合に、拘束分子が同定できる。Cry j 1 p106-120ペプチドを提示する拘束分子はDRB5*0101、Cry j 1 p211-225ペプチドを提示する拘束分子はDPA1*0101 - DPB1*0501、Cry j 2 p66-80ペプチドを提示する拘束分子は DRB5*0101、Cry j 2 p181-195ペプチドを提示する拘束分子はDPA1*0101 - PDB1*0201、Cry j 2 p186-200ペプチドを提示する拘束分子はDRB4*0101、Cry j 2 p341-355ペプチドを提示する拘束分子はDQA1*0102 - DQB1*0602であった（図6）。他のエピトープ部位についての解析結果は図3及び図4に記載されている。

実施例5 T細胞クローンのThタイプの同定

アレルギーの発症にはTh2細胞の関与が想定されている。現在の研究レベルでは、抗原刺激後、T細胞のTh1またはTh2細胞への分化が、特定のエピトープペプチド

またはHLA-クラスII遺伝子座レベルで規定されているのかはまだ、未解決な部分が多い。しかし、ペプチドで刺激後、Th2細胞が優位に誘導される場合には、ペプチド投与によりスギ花粉症が悪化する可能性が高い。実施例2で作製したT細胞クローンをT細胞が認識するエピトープペプチドで刺激し、IL-2、IL-4、IFN γ の産生量を測定することによってThタイプを決定した。

24-ウエルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した 1×10^5 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のエピトープペプチド、 5×10^5 個のT細胞クローンを1mlの10%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液中で24時間培養した。遠心で細胞を沈澱させ、培養上清を得た。培養上清中のIL-2、IL-4、IFN γ は市販のELISAキット [IL-2(R&D社製)]、IL-4 (メドジェニックス社製)、IFN γ (大塚アッセイ研究所製) で測定した。

各T細胞クローンの産生するIL-2、IL-4、IFN γ 量を図3、図4に示す。Cry j 1を認識するT細胞クローンは、Th2細胞が12、Th1細胞が1、Th0細胞が16であり、Th2がTh1よりも多かったが、Cry j 2を認識するT細胞クローンはTh2細胞が10、Th1細胞が8、Th0細胞が8であり、Th2とTh1とは同程度であった。個々のT細胞クローンの認識するT細胞エピトープ、拘束分子、Thタイプを比較すると、個々のT細胞クローンによってTh2、Th1、Th0タイプは異なり、同一のエピトープ、同一の抗原提示分子を認識する数個のT細胞クローンには、Th2細胞とTh1細胞が見いだされている。これらの結果は、Cry j 1またはCry j 2刺激後のT細胞のTh2、Th1、またはTh0細胞への分化は、特定のT細胞エピトープ、特定の拘束分子の組み合わせでは規定されていないことを意味している。つまり、T細胞エピトープ部位を含むペプチドは全て、本発明の多重エピトープペプチドの候補となりうることが判明した。

実施例6 多重エピトープペプチドの作製

Cry j 1及びCry j 2分子中に存在するIgE抗体エピトープ部位を同定した結果、Cry j 1にはこの一次構造を認識するIgEエピトープは存在しないこと、Cry j 2に

はIgE抗体エпитープが少なくとも4ヶ所存在することが明らかとなったが、これらのIgE抗体エпитープ部位は、T細胞エпитープ部位とは異なる部位であった。この知見をもとに、Cry j 1及びCry j 2のT細胞エпитープ部位のうち、図7に示すペプチドを選択した。

図7のペプチドa、bはそれぞれ図1のCry j 1のペプチドNo. 43、22に対応し、ペプチドcは図2のCry j 2のNo. 14に対応し、d、eはそれぞれ図2のCry j 2の37-38及び69-71のアミノ酸の一部からなるものである。

これらの6種類のペプチドを直列につなぎ合わせて多重エпитープペプチドを作製する場合、2つのペプチドとaとbはa-bの順で固定し残りの3つのペプチド(c、d及びe)をランダムにつなぎ合わせ且つ各ペプチドの間にArg-Argの配列を挿入した多重エпитープペプチドは下記の6種類となる。

C.A. # 1. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e

C.A. # 2. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d

C.A. # 3. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e

C.A. # 4. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c

C.A. # 5. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d

C.A. # 6. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c

実施例7 多重エпитープペプチドのヒトIgE抗体に対する反応性

実施例6で得た6種の多重エпитープペプチド(C.A. # 1～# 6)を0.2M酢酸緩衝液(pH4.5)に溶解させ、0.1ml/ウェルでブラックプレート(大日本製薬社製)に加えて4℃で一晩放置した。抗原溶液を除去した後、洗浄液で3回洗浄し、29名のスギ花粉患者及び健常人血清(4倍希釈)を加えて、37℃で4時間反応させた。血清を除去後、洗浄液で3回洗浄し、抗ヒトIgE抗体(Pharmacia社製)を室温で一晩反応させた。洗浄液で3回洗浄後、0.1mM 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトピラノシド/0.01M リン酸緩衝液(pH 7.0)、0.1M NaCl、1mM MgCl₂、0.1% NaN₃、0.1%BSAの基質溶液を加え、37℃で2時間反応させた。0.1M グリシン/Na

OH、pH10.3溶液をこれに加えて反応を停止させ、蛍光分光光度計(Labsystems)で蛍光強度を測定した。なお、各多重エпитープペプチドに対する陽性コントロールとしてビオチン標識ウサギ抗dエпитープIgGとペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ピアス社製)を反応させた。

この結果、29名全てのヒト血清は、6種の多重エпитープペプチド(C.A.#1～#6)全てについて蛍光強度が3～5であった(ブランク値は3又は4)。これに対してスギ花粉から抽出、精製した抗原であるCry j 1には、蛍光強度1,000以上が6名、100以上が14名、10以上が4名、9以下が5名であった。一方、ウサギ抗dエпитープペプチドIgGは6種のコンセンサスアレルゲンに対して3,000以上を示した(ブランク値は112、Cry j 1アレルゲンには230)。以上のことから、多重エпитープペプチドにおける各エпитープの接続順序はヒトIgE抗体との反応性に影響を与えないことが判明した(図8)。

実施例8 多重エпитープペプチドのT細胞エпитープの認識の有無

実施例6で得た多重エпитープペプチドのうちC.A.#4を構成する抗原ペプチドが実際にT細胞エпитープとして機能しているかどうかについて検討した。

96-ウエルミクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した 5×10^4 個の自己由来B細胞株、 2×10^4 個のT細胞クローンを、0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で、抗原として $50 \mu\text{g/ml}$ のCry j 1、 $2 \mu\text{g/ml}$ のCry j 2、多重エпитープペプチドC.A.#4を構成する個々の抗原ペプチド、または遺伝子発現で作製した $10 \mu\text{g/ml}$ のC.A.#4多重エпитープペプチドのいずれかと共に2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加後さらに16時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。結果を図9に示す。

Cry j 1 p106-120を認識するT細胞クローンPB8-3、Cry j 1 p211-225を認識するT細胞クローンPB8-34、Cry j 2 p66-80を認識するT細胞クローンPB4-22、Cry j 2 p181-195を認識するT細胞クローンPB14-5、Cry j 2 p186-200を認識するT細胞

胞クローンPB14-34はいずれも抗原ペプチドによく反応している。一方、多重エпитープペプチドの場合も、個々のペプチドと同様の強さでT細胞クローンが増殖応答している。Cry j 2 p341-355を認識するT細胞クローンPB14-19に関しては、多重エピトープペプチド刺激に対してやや弱い増殖応答が観察された。

以上の結果は多重エピトープペプチドに含まれる抗原ペプチドは各々エピトープとしてよく機能し、T細胞を活性化する能力を保持していることを示している。

実施例9 多重エピトープペプチドによるスギ花粉症患者末梢血リンパ球の増殖応答

多重エピトープペプチドはT細胞エピトープ部位を含むため、ペプチド免疫療法を試みる場合には、末梢血リンパ球に増殖応答を惹起させることが必要である。多重エピトープペプチドで末梢血リンパ球を刺激し、増殖応答が観察されるかについて調査した。

スギ花粉症患者または健常人由来末梢血リンパ球を10%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液に懸濁した後、96-ウエル丸底培養プレートの各ウエルに 2.5×10^5 個/ $200 \mu\text{l}$ になるように播種した。配列番号：1の多重エピトープペプチド、Cry j 1またはCry j 2のいずれかを、多重エピトープペプチドが最終濃度 $0.001 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ 、Cry j 1が $50 \mu\text{g/ml}$ 、Cry j 2が $2 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、6日間培養した。0.5 μCi の $[^3\text{H}]$ チミジンを添加してさらに16時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで $[^3\text{H}]$ チミジンの細胞内取り込みを測定した。

患者6名の中で5名の末梢血リンパ球が多重エピトープペプチドに対して増殖応答を示した。患者1名と健常者2名の末梢血リンパ球は増殖応答を示さなかった（図10）。

末梢血リンパ球の増殖応答は $0.1 \mu\text{g/ml}$ の多重エピトープペプチド刺激で起こり始め、投与量に比例して増殖応答は増大した。この結果から、*in vitro*で十分なT細胞増殖応答を誘導する多重エピトープペプチドの濃度は $10 \mu\text{g/ml}$ 以上であると

判断された。

17名のスギ花粉症患者と2名の健常者由来末梢血リンパ球を $10\mu\text{g/ml}$ の多重エпитープペプチドで刺激し、T細胞応答を算定した。健常人の末梢血リンパ球ではT細胞増殖応答能が観察されなかった。17名の患者では最高で9,652cpmの $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みが観察された。抗原刺激なしの末梢血リンパ球の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを1と計算し、抗原存在下の末梢血リンパ球の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み値を刺激係数 (SI) で表現し、結果を図11に示した。T細胞エпитープの同定の際には $\text{SI} > 2$ 以上を陽性とみなすため、同様に $\text{SI} > 2$ 以上をペプチドに対して増殖応答が観察されたとみなすことにすると、17名の患者の中で13名 (76.5%) に増殖応答がみられた。この結果から、スギ花粉症患者にペプチドを投与した場合には76.5%の患者においてペプチド免疫療法の効果があると判定される。

スギ花粉症患者に、本発明の多重エпитープペプチドでペプチド免疫療法を試みる場合、前もって、患者由来末梢血リンパ球の多重エпитープペプチドに対する増殖応答能を調査し、増殖応答の見られる患者を選定することができる。この試験によって多重エпитープペプチドを用いたペプチド免疫療法がその患者に適用できるのかが判定できるし、増殖応答能の高さから治療効果についてもある程度の予測ができると考えられる。

実施例10 マウスを用いたスギ花粉アレルゲン投与による免疫寛容の誘導

スギアレルゲンを投与して治療を行なう、いわゆる減感作治療のメカニズムについて、詳細はわかっていない。そこでマウスを用いた動物実験を行なった。スギ花粉アレルゲン、Cry j 1 を1匹当たり $300\mu\text{g}$ 、CB6F1マウス (雌、5匹) の皮下に5日間隔で2回投与した。コントロールとして同容量の PBS を皮下投与 (雌、5匹) した。さらに5日後に Cry j 1 $100\mu\text{g}$ を Alum アジュバンドと共に皮下に投与して免疫を行ない、さらに10日後にリンパ節細胞を単離し、コントロール群マウスのリンパ節細胞、Cry j 1 投与マウスのリンパ節細胞をそれぞれの群単位でプールした。プールしたリンパ球に Cry j 1 を 0, 50, 150 $\mu\text{g/ml}$ 加え、さら

に3日間培養を行ない、培養上清を採取して含まれる IL-2 を測定した (Endogen 社製)。その結果を図 1 2 に示す。コントロール群である PBS 投与マウスは Cry j 1 濃度が 0, 50, 150 $\mu\text{g/ml}$ と増加すると共に IL-2 の産生量が増加した。一方、Cry j 1 投与マウスはこれらのコントロールマウスに比べ明かに IL-2 の産生量が減少し、スギ花粉アレルゲン投与によって免疫寛容が生じた。この結果は現在用いられているスギ花粉アレルゲンによる減感作療法の有効例を再現している。

実施例 1 1 CB6F1マウスのT細胞エピソードの同定

8週齢の雄CB6F1マウスをアジュバント (Imject Alum: ピアス社製) と共に組み換えCry j 2 (rCry j 2) 10 μg で2週間おきに3回免疫した(ip)。最終免疫から1週間後にマウス3匹から脾細胞を調製し一つにまとめた。96ウエルプレート (ファルコン社製) 1ウエルに対し脾細胞 (5×10^6) を15残基からなる74種類のCry j 2のオーバーラッピングペプチド (0.115 μM) のそれぞれと共に0.2mlのRPMI培地 (10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン) で培養した。対照としてPBS、50 $\mu\text{g/ml}$ Cry j 1、0.3 $\mu\text{g/ml}$ rCry j 2のそれぞれに対する反応も検討した。各々の試験試薬に対し3ウエル播種し、37°C、5% CO_2 条件下で3日間培養した。最後の6時間0.5 μCi /ウエルの $[\text{}^3\text{H}]$ -チミジンでパルスラベルを行いセルハーベスター (Inotech、ベルトールドジャパン社製) で細胞をガラスフィルター上に補集し、乾燥した後、液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 4530、パッカードジャパン社製) で $[\text{}^3\text{H}]$ -チミジンの細胞内取り込みを測定した。

rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは抗原であるrCry j 2に強い反応性を示したが、もう一つのスギ花粉主要アレルゲンであるCry j 1には反応せず、この系が抗原特異的反応であることが確認された。そして、rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは、調べた74種類のオーバーラッピングペプチドのうち図 2 に示すNo.14ペプチドとNo.48ペプチドに顕著な応答性を示した。このことからCB6F1マウスにおいてNo.1

4とNo.48のペプチドが主要T細胞エпитープとして抗原提示に関与していることが示された。ヒトにあってもNo.14とNo.48のペプチドは主要T細胞エпитープペプチドであることから、CB6F1マウスはスギ花粉に対するペプチド免疫療法に使用するペプチドの有効性を評価するうえで有用なモデル動物になりうると判断された。

実施例 1 2 抗原ペプチドNo.14のインビボにおける免疫応答

1群8匹の雄CB6F1(8週令、雄)マウス1匹当り生理食塩水に溶解した3mg No.14ペプチドを、5日間隔で2回皮下投与した。対照群としては等容量(100 μ l)の生理食塩水を同様に投与した。2回目のペプチド投与後5日目にインジェクトアルム(Imject Alum)と混合したrCry j 2(50 μ g/匹)で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウエルプレート(ファルコン)1ウエルに対し脾細胞(5×10^6)をrCry j 2(3 μ g/ml)と共に0.2mlのRPMI培地(10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン)で培養した。対照としてrCry j 2を含まない条件下で培養した。 3 H-チミジンによるT細胞増殖の測定は、実施例1に記載された方法に準じて行った。サイトカイン測定は、対照を含めた3種類のペプチド投与群(0.3, 1.3, 10 μ g/ml)について、in vitroで0.3 μ g/mlのCry j 2で刺激したときの培養上清を用いた。

CB6F1マウスに予めNo.14ペプチドを皮下投与しておくで続くrCry j 2による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意($p < 0.01$)に抑制された(図13)。IL-2産生に関しては、3種類のペプチド投与群においてそれぞれ対照群より有意に減少した。このことからマウスのモデル系においてNo.14ペプチドはスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法の予防効果を有することが示された。

実施例 1 3 抗原ペプチドNo.48のインビボにおける免疫応答

6週齢の雄CB6F1マウス1匹当り生理食塩水に溶解した3mg No.48ペプチドを、5日間隔で2回皮下投与した。対照群としては等容量(200 μ l)の生理食塩水を同様に投与した。ペプチド投与群及び対照群の動物数は各々8匹とし、2回目のペプチ

ト投与から5日目にアジュバント (Imject Alum) と混合したrCry j 2(50 μ g)で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウエルプレート (ファルコン) 1ウエルに対し脾細胞 (5×10^6) をrCry j 2 (3 μ g/ml) と共に0.2mlのRPMI培地 (10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/mlペニシリン、50 μ g/mlストレプトマイシン) で培養した。対照としてrCry j 2を含まない条件下で培養した。 3 H-チミジンによるT細胞増殖の測定は実施例10に記載された方法に準じて行った。

CB6F1マウスに予めNo.48ペプチドを皮下投与しておくとするrCry j 2による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意に抑制された($p < 0.05$)。このことからマウスのモデル系においてNo.48ペプチドはスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法による予防効果を有することが示された (図14)。

以上の実験結果から、従来行われてきたヒトにおけるスギ花粉抽出エキスによる減感作療法がT細胞エピトープを介した作用機作であることが明らかになった。

実施例14 コア配列の決定

Cry j 1 ペプチド番号22番 (p106-120) のT細胞ラインおよびT細胞クローン増殖応答に必要なアミノ酸配列(core)を決定するために、図15に示すようにこのペプチドのN末端およびC末端から1残基づつのアミノ酸を削除してp107-120 (p22-2), p108-120 (p22-3), p109-120(p22-4), p110-120(p22-5), p111-120(p22-6), p106-119(p22-7), p106-118(p22-8), p106-117(p22-9), p106-116(p22-10), p106-115(p22-11)の11種類のペプチドをペプチド合成機(PSSM-8, 島津製作所製)により合成した。Cry j 1ペプチド番号22番のp106-120 と反応する3名のスギ花粉症患者のT細胞ライン (PJ, PR, PB)、および患者1名のT細胞クローン (PB 8-3, PB 8-2, PB 9-39) を実施例1及び2の方法を用いてこれら11種類のペプチドに対する反応性を検討した。2種類のT細胞ライン(PJ, PB)と2種類のT細胞クローン(PB 8-2, PB 9-39)はp106-120 (p22-1)を認識して増殖したが、1種類の

T細胞ラインとT細胞クローンは増殖応答を示さなかった(図15)。この結果、p106-120コア配列は「FIKRVSNI」の9残基であることが判明した(この9残基をCry j 1 #22 core と表示する)。

実施例15 スギ花粉およびヒノキ花粉アレルゲン由来T細胞エпитープを含む多重エпитープペプチド

ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1 のT細胞エпитープ(特願平8-153527号)であるペプチド番号8(p71-90; IFSKNLNIKLNMPLYIAGNK),あるいはペプチド番号32(P311-330; SSGKNEGTTNIYNNNEAFKVE)と実施例14で得られたCry j 1 #22 コア配列「FIKRVSNI」をつないだペプチド2種類 (Cha o 1 #8-Cry j 1 #22 core, Cha o 1 #32-Cry j 1 #22 core)をペプチド合成機 (PSSM-8; 島津製作所製) で合成した。Cha o 1 #8とCry j 1 #22 core, Cha o 1 #32とCry j 1 #22 coreとの間には RR 配列を挿入した。即ち Cha o 1 #8-Cry j 1 #22 core (配列番号: 4) と Cha o 1 #32-Cry j 1 #22 core (配列番号: 5) である。

スギ花粉症患者およびヒノキ花粉症患者からそれぞれCry j 1 特異的T細胞ラインおよびCha o 1 特異的T細胞ラインをそれぞれ作製した。Cry j 1 特異的T細胞ラインおよびCha o 1 特異的T細胞ラインは、結核菌抗原(PPD)および溶連菌細胞壁(SCW)抗原とは反応せず、またCry j 1 特異的T細胞ラインはCry j 1 #22あるいはCry j 1 #22 core とは反応するが、Cha o 1 #8 及び#32とは反応せず、Cha o 1 特異的T細胞ラインはCha o 1 #8及び#32とは反応するが Cry j 1 #22あるいはCry j 1 #22 coreとは反応しなかった(図16)。一方これらのT細胞ラインはいずれも、配列番号: 4の多重エпитープペプチド及び配列番号: 5の多重エпитープペプチドの両方に反応した。これらの結果から、スギ花粉およびヒノキ花粉アレルゲン由来のT細胞エпитープをつないだ多重エпитープペプチドは、スギ花粉症患者およびヒノキ花粉症患者のペプチド免疫療法に有効であることが明らかとなった。

実施例16 アナログペプチドの増殖応答およびサイトカイン産生

Cry j 1#22 coreのT細胞エпитープペプチドのアミノ酸を置換することによってT細胞の活性を調節することが可能か否かを、2つのクローンPJ7-9及びPB10-18を用いて検討した。Cry j 1ペプチド番号22番p106-120 に反応するT細胞クローンPJ 7-9及びPB10-12は、DRB5*0101を拘束分子とし、Cry j 1#22coreの9残基を認識する。この9残基を含む13残基のペプチドp108-120 (VFIKRVSNVIIHG) 中の9残基の各アミノ酸を、類似アミノ酸、非類似アミノ酸の2種類のアミノ酸によって置換したアナログペプチドを合成した(図17、18)。そして、これらのアナログペプチドに対するT細胞クローンPJ7-9及びPB10-18の反応性を $[^3\text{H}]$ チミジンの取込み量で調べた。反応溶液中のサイトカイン濃度は、R&D Systems 社製のサイトカイン測定キットで測定した。その結果を、図17及び図18に示した。ここで、アミノ酸置換していない13残基のペプチドを反応させた上清のIFN γ 、IL-4、IL-2、IL-5の産生量及び細胞の $[^3\text{H}]$ チミジンの取込み量をそれぞれ100%とした。PJ7-9クローンの場合、Cry j 1#22core「FIKRVSNVI」の3、4、6番目の各アミノ酸部分「K」「R」「S」は類似アミノ酸置換と非類似アミノ酸置換の両者、あるいは非類似アミノ酸置換により $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みおよびサイトカインの産生量がそれぞれ著しく抑制された(図17)。従って、これらの部分のアミノ酸はペプチドを介したHLA 分子とT細胞レセプター分子の複合体形成に重要な部分と考えられる。1番目のアミノ酸(F)を類似アミノ酸であるYに置換しても $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量とIL-4、IL-5の産生量に変化は認められないが、非類似アミノ酸である「S」に置換すると $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量に変化は認められないにもかかわらず、IFN γ とIL-2の産生量は著しく増大した。PB10-18クローンの場合は、Cry j 1#22coreの1、2、3、4、6、7、8番目のアミノ酸置換によって $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みが抑制され、これらの部分のアミノ酸はペプチドを介したHLA 分子とT細胞レセプター分子の複合体形成に重要な部分と考えられる。さらに6、7、8番目のアミノ酸置換によってIL-5の産生量に比較してIL-2の産生抑制が認められた(図18)。これらの結果から、Cry j 1#22coreの1番目の

アミノ酸FをSに置換した「SIKRVSNVI」が IFN- γ の産生量を増大させたことにより、アレルギーの治療剤として有用であることが明らかとなった。

産業上の利用の可能性

本発明の多重エピトープペプチドは、異なるアレルゲン分子由来のT細胞エピトープペプチドを含み、かつ、アレルギー患者集団の中で遺伝子頻度の高いHLAクラスII分子で提示されるペプチドを含み、さらには、HLAクラスII遺伝子座 (DR、DQ、DP) 間で異なる分子で提示されるペプチドを数個含むので、最小の多重エピトープペプチドの長さで、有効対象患者数を拡大したペプチド免疫療法が期待できる。

また、アレルギー患者に、本発明の多重エピトープペプチドを用いてペプチド免疫療法を試みる場合、前もって、患者由来の末梢血リンパ球の該ペプチドに対する増殖応答能を調査し、増殖応答が惹起される患者を選定することができる。この調査によって、多重エピトープペプチドによるペプチド免疫療法がその患者に適用できるかどうかの判定が可能であり、増殖応答能の高さから、治療効果についてもある程度予測が可能である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 80

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

MKVTVAFNQF GPNRRVFIKR VSNVIIHGRR IDIFASKNFH 40

LQKNTIGTGR RISLKLTSKG IASRRVDGII AAYQNPASWK 80

配列番号 : 2

配列の長さ : 105

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

MKVTVAFNQF GPNRRVFIKR VSNVIIHGRR IDIFASKNFH 40

LQKNTIGTGR RWKNNRIWLQ FAKLTGFTLM GRRLKMPMYI 80

AGYKTFDGRR VDGIIAAYQN PASWK 105

配列番号 : 3

配列の長さ : 134

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

MKVTVAFNQF GPNRRVFIKR VSNVIIHGRR IDIFASKNFH 40
LQKNTIGTGR RWKNNRIWLQ FAKLTGFTLM GBRPLWIIFS 80
GNMNIKLKMP MYIAGYKTFD GRRAEVSYPH VNGAKFIRRV 120
DGIIAAYQNP ASWK 134

配列番号 : 4

配列の長さ : 31

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

IFSKNLNIKL NMPLYIAGNK RRFIKRVSNV I 31

配列番号 : 5

配列の長さ : 31

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

SSGKNEGNI YNNNEAFKVE RRFIKRVSNV I 31

請求の範囲

1. 異なる T細胞エпитープ領域を連結した 1 分子の直鎖状ポリペプチドであつて、
 - (1) 前記 T細胞エпитープ領域の各々が前記アレルゲンに感受性の患者集団において測定した重要度指数が約 100 以上を示し、
 - (2) 前記アレルゲンに対し感受性の患者集団の少なくとも 70% 以上の患者の末梢血リンパ球と反応し、
 - (3) 前記アレルゲンに対する感受性の患者集団の IgE 抗体と実質的に反応しない、多重エпитープペプチドの有効量を含有することを特徴とする、ペプチド免疫療法剤。
2. 異なる T細胞エпитープ領域が 2 種以上の異なるアレルゲン分子に由来するものである、請求項 1 記載のペプチド免疫療法剤。
3. 異なるアレルゲン分子がスギ花粉アレルゲン Cry j 1 および Cry j 2 である、請求項 2 記載のペプチド免疫療法剤。
4. 各々の T細胞エпитープ領域の間に抗原提示細胞内でプロセッシングを受ける部位を介在させた、請求項 1 記載のペプチド免疫療法剤。
5. 抗原提示細胞内プロセッシングを受ける部位がアルギニンダイマーまたはリシンダイマーである、請求項 4 記載のペプチド免疫療法剤。
6. 配列番号：1、配列番号：2 または配列番号：3 のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項 3 記載のペプチド免疫療法剤。
7. HLA クラス II 分子 DRB5*0101、DRB4*0101、DQA1*0102-DQB1*0602、DPA1*0101-DPB1*0501 または DPA1*0101-DPB1*0201 の少なくとも 1 つを拘束分子とするエпитープを含む、請求項 3 記載のペプチド免疫療法剤。
8. 異なるアレルゲン分子がスギ花粉アレルゲン Cry j 1 およびヒノキ花粉アレルゲン Cha 0 1 である請求項 2 記載のペプチド免疫療法剤。

9. 配列番号：4、または配列番号：5に記載のアミノ酸配列を含むペプチドである、請求項8記載のペプチド免疫療法剤。

1 / 18

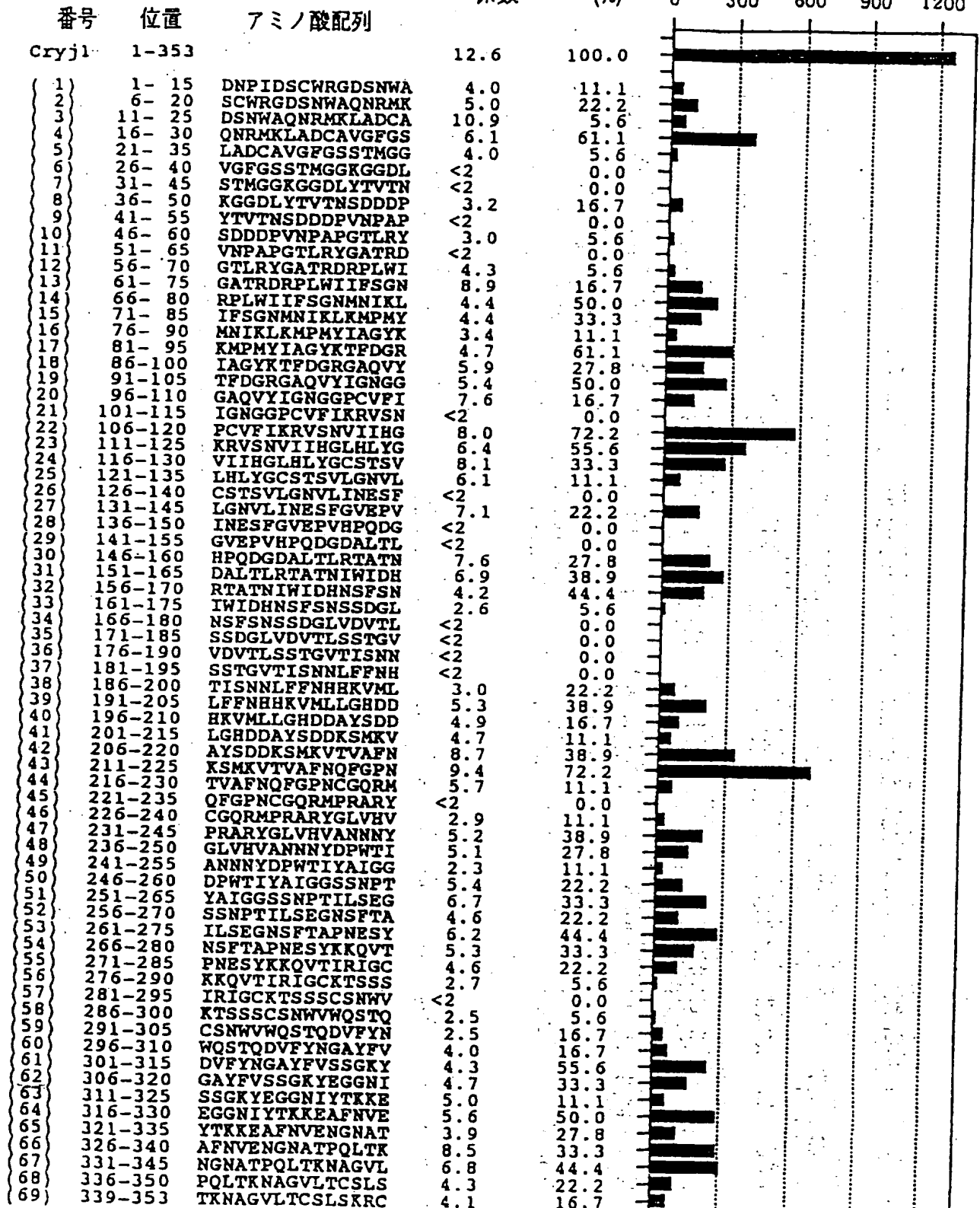
重要度指数

図 1

Cry j 1 ペプチド

平均刺激
係数出現頻度
(%)

(平均刺激係数 x 出現頻度(%))

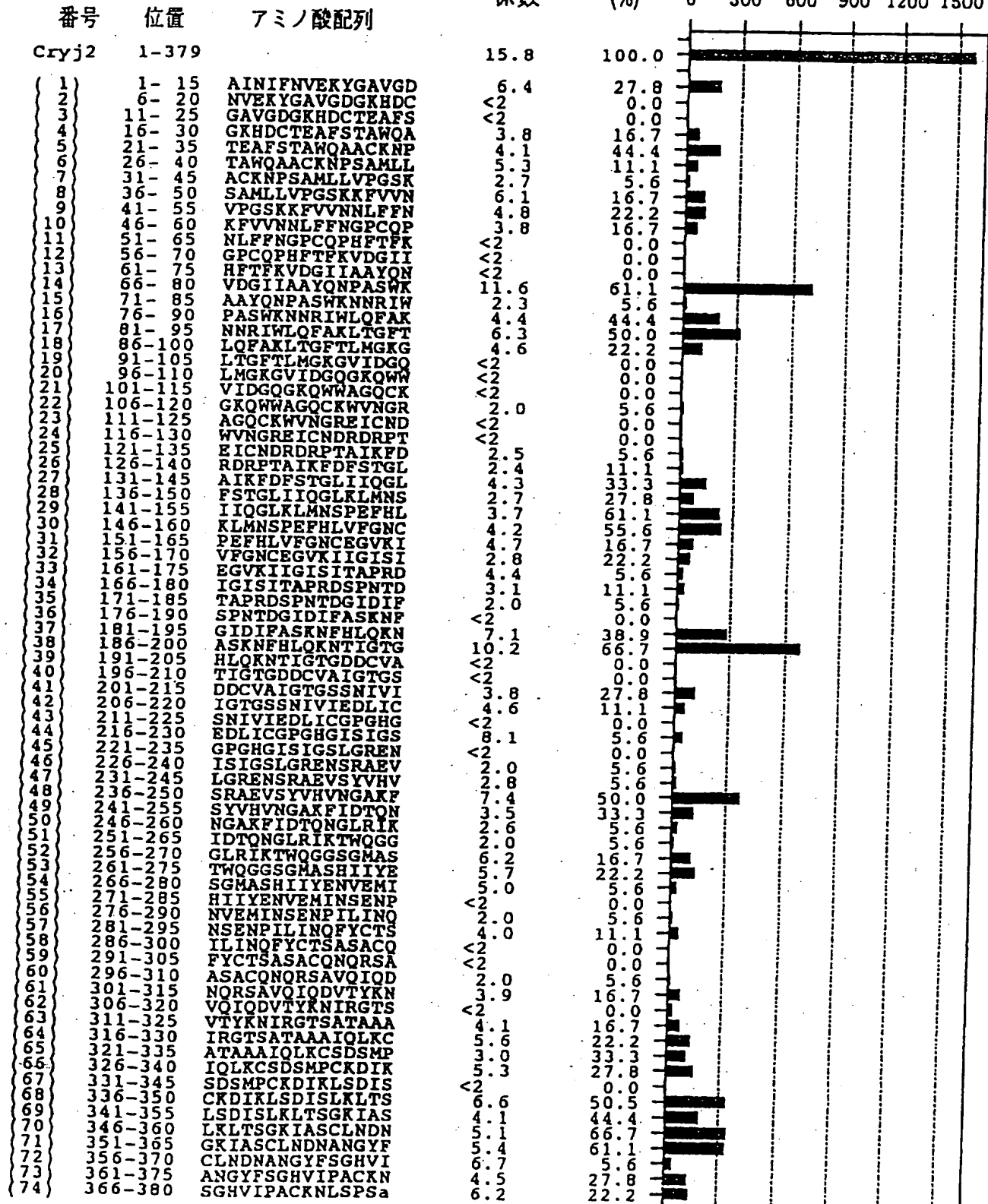


2 / 18

図 2

重要度指数

Cry j 2 ペプチド

平均刺激
係数出現頻度 (平均刺激係数 x 出現頻度(%))
(%)

差違 → 田紙 (相別76)

3/18

図3

Cry j 1 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

| T 細胞 クローン | エピトープ部位 | | 拘束分子 | リンフォカイン産生(pg/ml) | | | Th* タイプ |
|--------------|---------|---------|----------------------|------------------|--------------|-------|------------|
| | 番号 | 位置 | | IL-2 | IFN γ | IL-4 | |
| PJ4-6 | 4 | 16-30 | DQA1*0102 DQB1*0602 | <31 | 1500 | 334 | Th0 |
| PB8-1 | 4 | 16-30 | " | <31 | <31 | 814 | Th2 |
| PB9-37 | 13 | 61-75 | DPA1*0101-DPB1*0501 | <31 | <31 | 7760 | Th2 |
| PB10-24 | 13 | 61-75 | " | 39 | 151 | 4500 | Th2 |
| PJ1-27 | 19 | 91-105 | DQ | 32 | 1220 | 224 | Th0 |
| PB3-27 | 22 | 106-120 | DRB5*0101 | 250 | 332 | 21000 | Th2 |
| PB8-2 | 22 | 106-120 | " | 190 | 2110 | 5709 | Th0 |
| PB8-3 | 22 | 106-120 | " | <31 | 1270 | 10100 | Th0 |
| PB9-39 | 22 | 106-120 | " | 48 | 51 | 5120 | Th2 |
| PB10-18 | 22 | 106-120 | " | 410 | 46 | 7840 | Th2 |
| PJ4-29 | 22 | 106-120 | " | 4680 | 14200 | 6610 | Th0 |
| PJ7-9 | 22 | 106-120 | " | 1370 | 1040 | 12200 | Th2 |
| PJ5-6 | 30 | 145-160 | DQA1*0102-DQB1*0602 | 1500 | 1170 | 5920 | Th0 |
| PJ5-9 | 30 | 145-160 | " | 1720 | 825 | 266 | Th0 |
| PB11-21 | 31 | 151-165 | DRB1*0901 | 4190 | >20000 | 4510 | Th0 |
| PB11-24 | 31 | 151-165 | " | 670 | 11700 | 1950 | Th0 |
| PB6-37 | 31 | 151-165 | " | <31 | <31 | 49 | Th2 |
| PB1-8 | 39 | 191-205 | DQA1*0102-DQB1*0602 | 820 | 188 | 1760 | Th0 |
| PB9-34 | 39 | 191-205 | DRB1*0901又はDRB4*0101 | <31 | 86 | 1680 | Th2 |
| PB2-14 | 43 | 211-225 | DPA1*0101-DPB1*0501 | <31 | 376 | 2320 | Th0 |
| PB7-2 | 43 | 211-225 | " | 84 | 2740 | 2080 | Th0 |
| PB8-32 | 43 | 211-225 | " | <31 | 4870 | 1840 | Th0 |
| PB8-34 | 43 | 211-225 | " | 78 | 14800 | 3040 | Th0 |
| PB11-23 | 43 | 211-225 | " | <31 | 3990 | 1260 | Th0 |
| PB11-26 | 43 | 211-225 | " | 32 | 1100 | 6520 | Th0 |
| PB4-20 | 43 | 211-225 | " | <31 | <31 | 133 | Th2 |
| PB10-4 | 43 | 211-225 | " | <31 | <31 | 4170 | Th2 |
| PB8-4 | 51 | 251-265 | DQA1*0102-DQB1*0602 | 44 | 36 | 4050 | Th2 |
| PJ4-20 | 66 | 326-340 | DQA1*0102-DQB1*0602 | 560 | 3080 | <32 | Th1 |

* IL-4/IFN γ >10 を Th2、IFN γ /IL-4 >10 を Th1 その中間を Th0 と定義する。

4/18

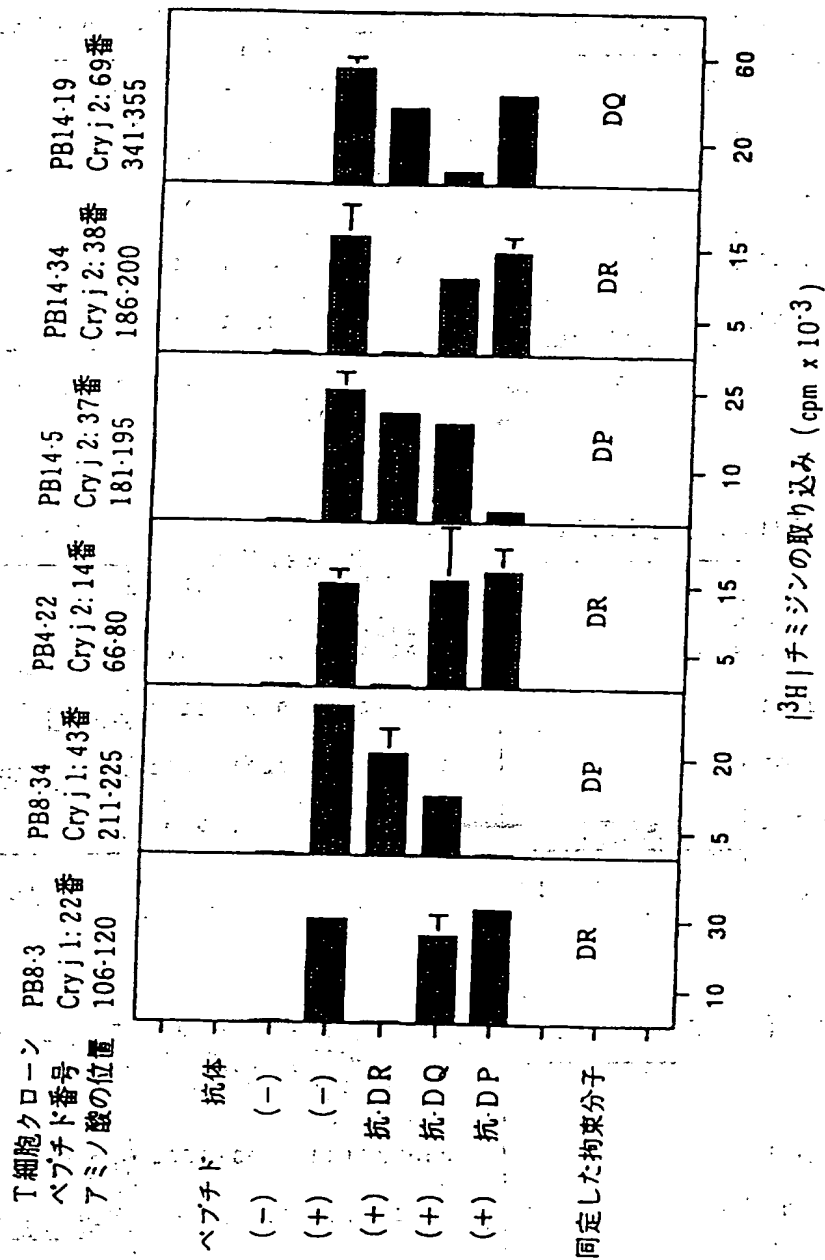
図 4

Cry j 2 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

| T 細胞 クローン | エピトープ部位 | | 拘束分子 | リンフォカイン産生(pg/ml) | | | Th* タイプ |
|--------------|---------|---------|----------------------|------------------|--------------|------|------------|
| | 番号 | 位置 | | IL-2 | IFN γ | IL-4 | |
| PB5-29 | 4 | 16- 30 | DRB1*0901又はDRB4*0101 | <31 | 503 | 97 | Th0 |
| PB11-40 | 4 | 16- 30 | " | <31 | <31 | 50 | Th2 |
| PB14-4 | 4 | 16- 30 | " | <31 | <31 | <16 | Thp |
| PB12-33 | 8 | 36- 50 | DRB1*1501 | <31 | >8000 | <16 | Th1 |
| PR2-25 | 8 | 36- 50 | " | 47 | <31 | 977 | Th2 |
| PR5-40 | 8 | 36- 50 | " | 1150 | 1330 | 355 | Th0 |
| PB3-32 | 14 | 66- 80 | DRB5*0101 | <31 | <31 | 323 | Th2 |
| PB4-21 | 14 | 66- 80 | " | <31 | 109 | 239 | Th0 |
| PB4-22 | 14 | 66- 80 | " | <31 | 483 | 158 | Th0 |
| PC1-8 | 14 | 66- 80 | " | <31 | 2710 | 32 | Th1 |
| PR4-20 | 14 | 66- 80 | " | <31 | 312 | 338 | Th0 |
| PR3-21 | 14 | 66- 80 | " | <31 | <31 | 338 | Th2 |
| PB13-18 | 17 | 76- 90 | DPA1*0101-DPB1*0501 | <31 | 3320 | 231 | Th1 |
| PB11-32 | 17 | 76- 90 | " | 138 | 60 | 2090 | Th2 |
| PR1-20 | 31 | 151-165 | DRB1*0901 | <31 | <31 | 18 | Th2 |
| PR4-39 | 31 | 151-165 | " | <31 | <31 | <16 | Thp |
| PB14-5 | 37 | 181-195 | DPA1*0101-DPB1*0201 | 87 | 126 | 469 | Th0 |
| PB14-13 | 37 | 181-195 | " | <31 | 59 | 2440 | Th2 |
| PB14-34 | 38 | 186-200 | DRB4*0101 | 186 | 420 | 93 | Th0 |
| PC3-40 | 38 | 186-200 | " | <31 | <31 | 379 | Th2 |
| PB5-3 | 48 | 236-250 | DRB1*1501又はDRB5*0101 | 2570 | >8000 | 525 | Th1 |
| PR2-34 | 65 | 321-335 | DRB1*0901 | 57 | 1990 | 464 | Th0 |
| PR3-30 | 66 | 326-340 | DQA1*0102-DQB1*0602 | <31 | 106 | <80 | Th1 |
| PR5-18 | 66 | 326-340 | " | <31 | <31 | <16 | Thp |
| PC1-13 | 68 | 336-350 | DPA1*0202-DPB1*0501 | <31 | <31 | <16 | Thp |
| PB12-8 | 69 | 341-355 | DQA1*0102-DQB1*0602 | <31 | 3210 | <16 | Th1 |
| PR5-12 | 69 | 341-355 | " | <31 | <31 | 2528 | Th2 |
| PR2-31 | 69 | 341-355 | " | <31 | <31 | 332 | Th2 |
| PB14-19 | 70 | 346-360 | " | <31 | 3730 | <16 | Th1 |
| PB13-38 | 70 | 346-360 | " | <31 | 2020 | <16 | Th1 |

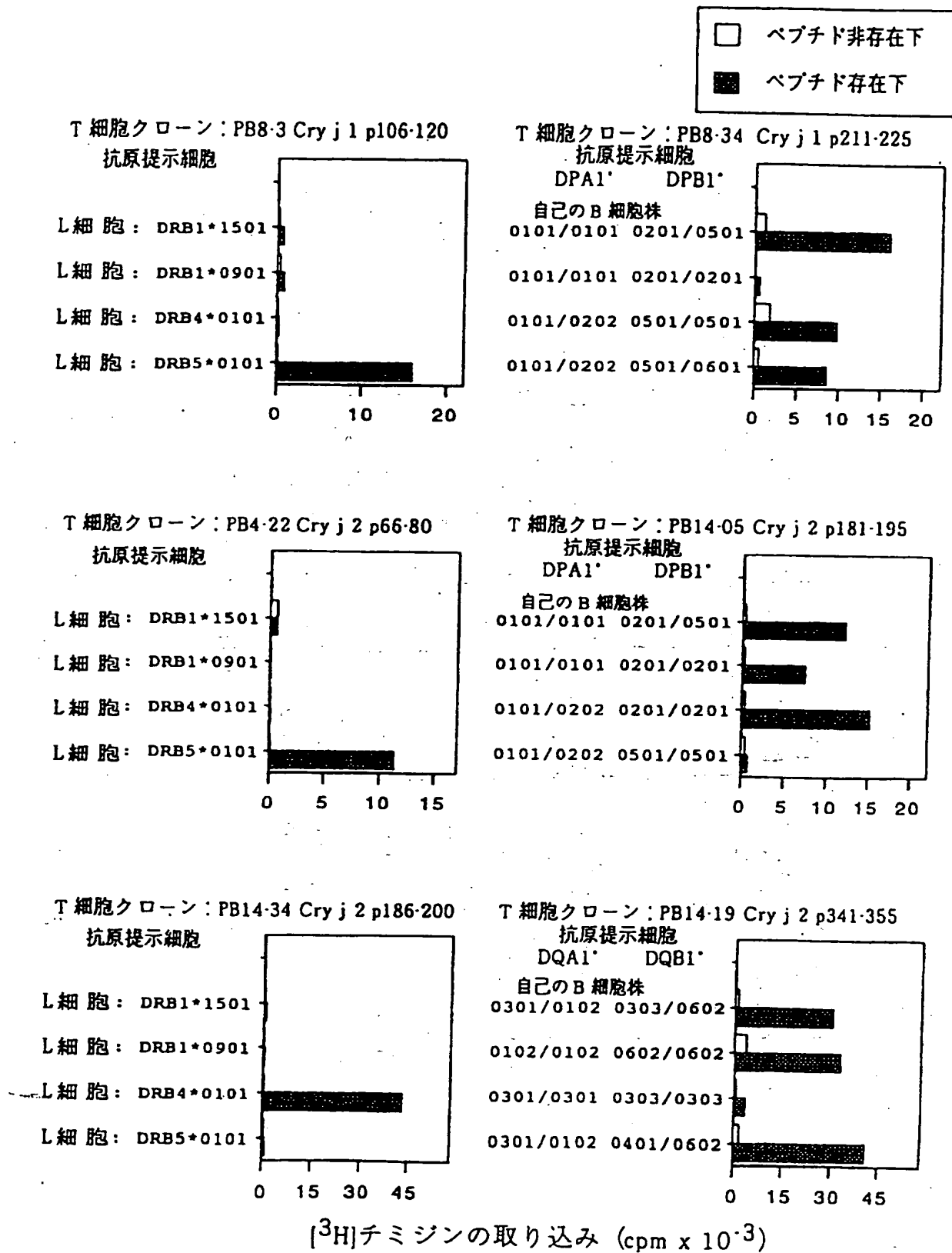
* IL-4/IFN γ >10 を Th2、IFN γ /IL-4 >10 を Th1、その中間を Th0、リンフォカイン産生が認められない場合を Thp と定義する。

図 5



6 / 18

図 6



美慈 → 田紙 (田田田)

7 / 18

☒ 7

- a Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn
- b Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly
- c Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys
- d Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile
Gly Thr Gly
- e Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn
Gly Tyr Phe

8/18

8

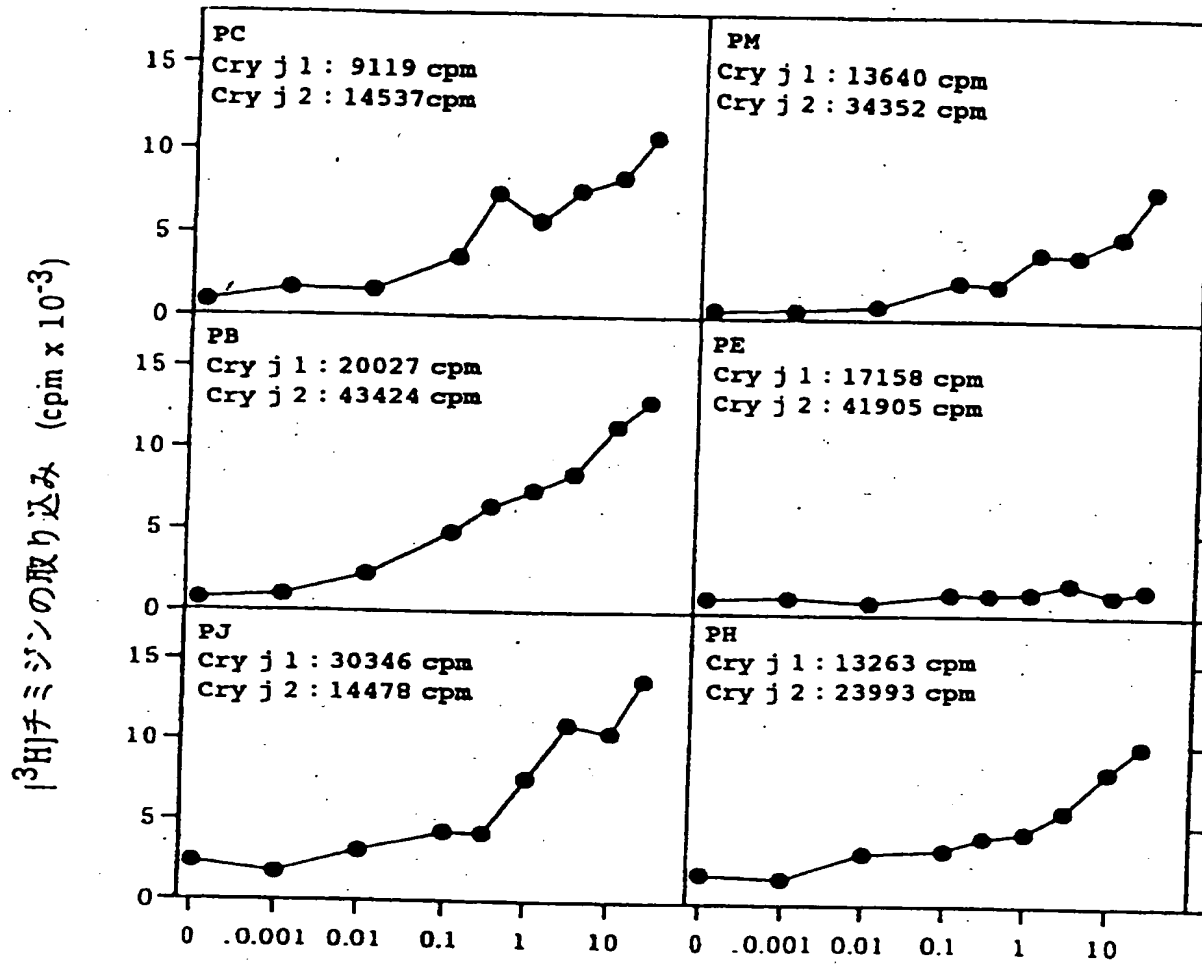
ペプチド組成物（#1～#6）のヒトIgEとの反応性

| 検体番号（血清） | アランクス | スギ花粉抽出抗原 | C.A.#1 | C.A.#2 | C.A.#3 | C.A.#4 | C.A.#5 | C.A.#6 |
|-------------|-------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 3 | 2105 | 5 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| 2 | 3 | 1133 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 3 | 3 | 1126 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| 4 | 3 | 1095 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| 5 | 3 | 1047 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 6 | 3 | 1003 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 7 | 4 | 710 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 8 | 3 | 521 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 9 | 3 | 314 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 10 | 3 | 298 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 |
| 11 | 3 | 279 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 12 | 3 | 253 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 13 | 3 | 239 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 14 | 3 | 235 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 15 | 3 | 233 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 16 | 3 | 226 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 17 | 3 | 190 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 18 | 3 | 162 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 19 | 3 | 123 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 20 | 3 | 106 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 21 | 4 | 45 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 22 | 3 | 14 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 23 | 3 | 13 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 24 | 3 | 11 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 25 | 3 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 26 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 27 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 28 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| 29 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| ウサギ抗ペプチドIgG | 112 | 230 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | | 3754 | 3829 | 3769 | 3716 | 3841 | 3798 |

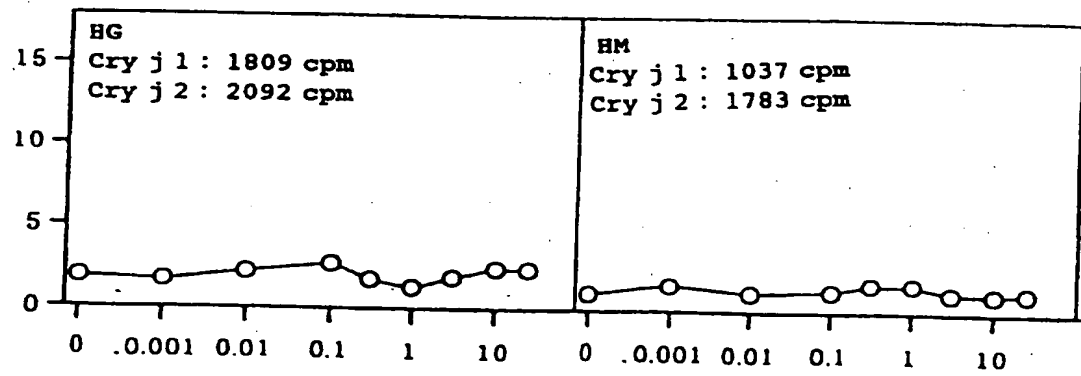
10/18

図 10

スギ花粉症患者

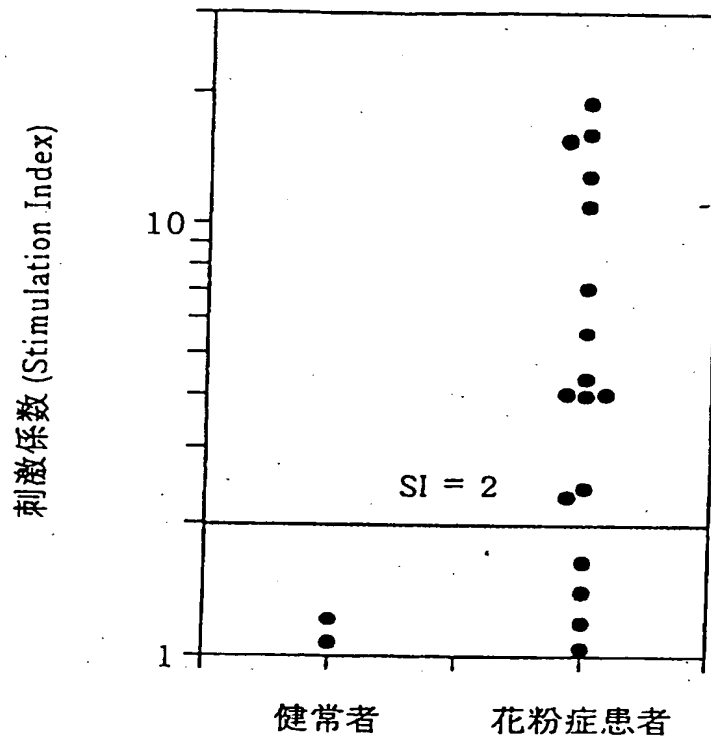


健常者

コンセンサスアレルゲン ($\mu\text{g/ml}$)

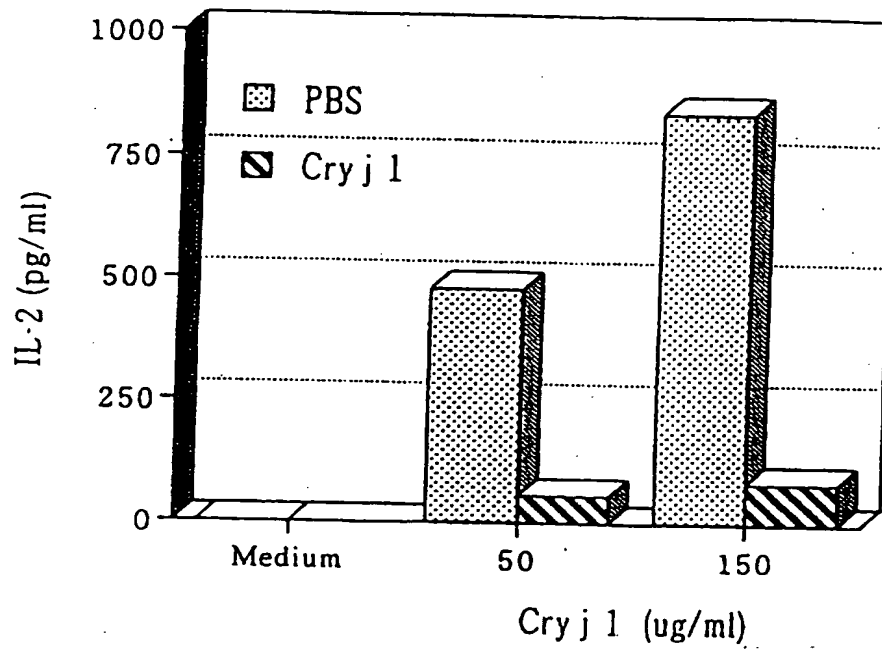
11/18

図 11



12/18

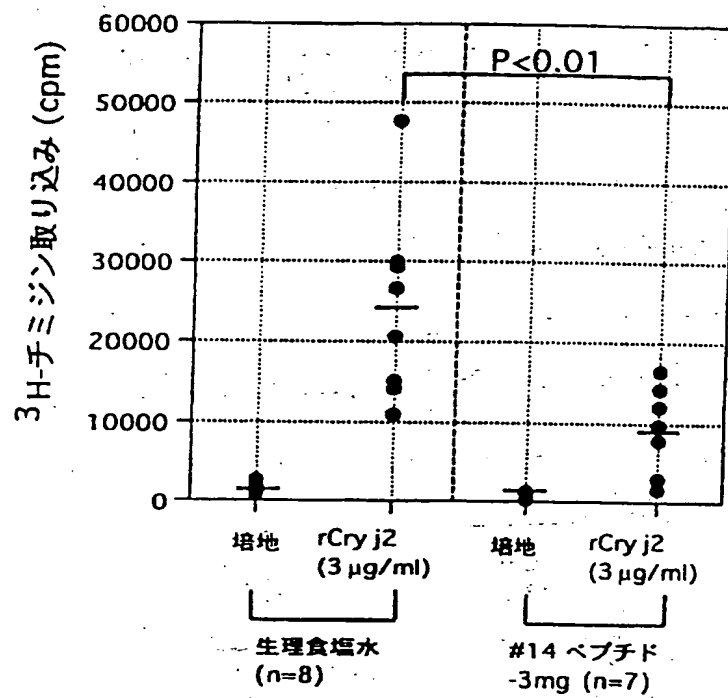
図 12



羊森→田紙 (規則26)

13/18

図 13



14/18

図 14

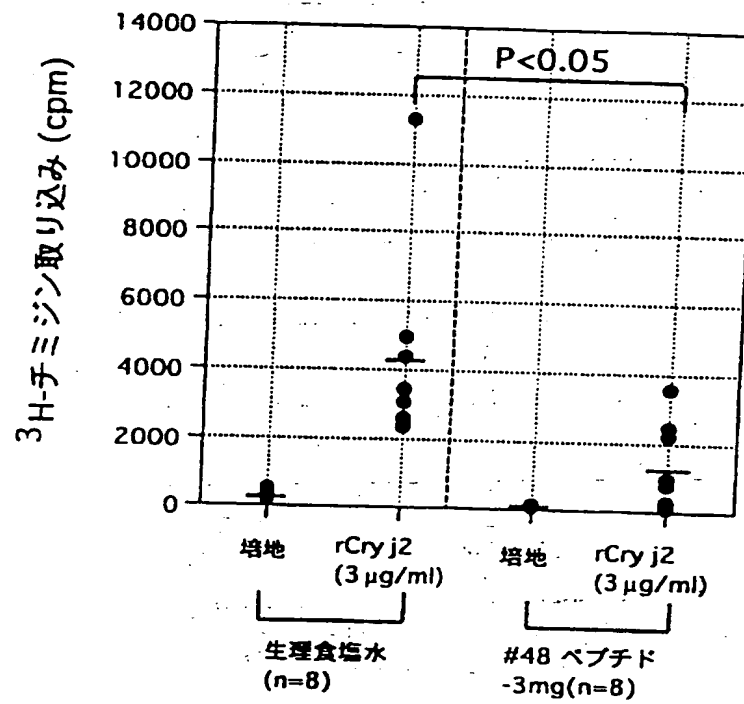


図 15

T細胞クローン

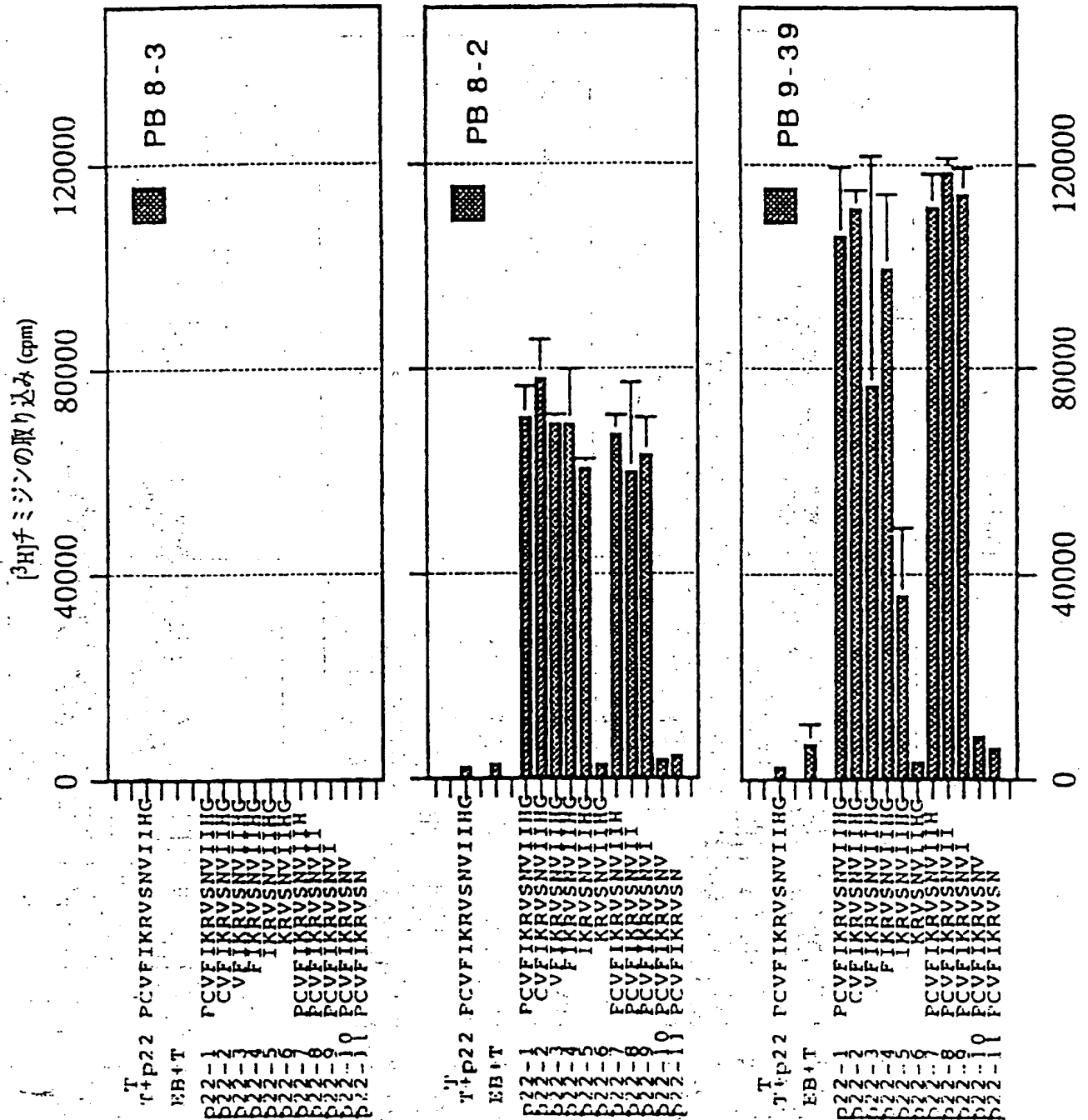
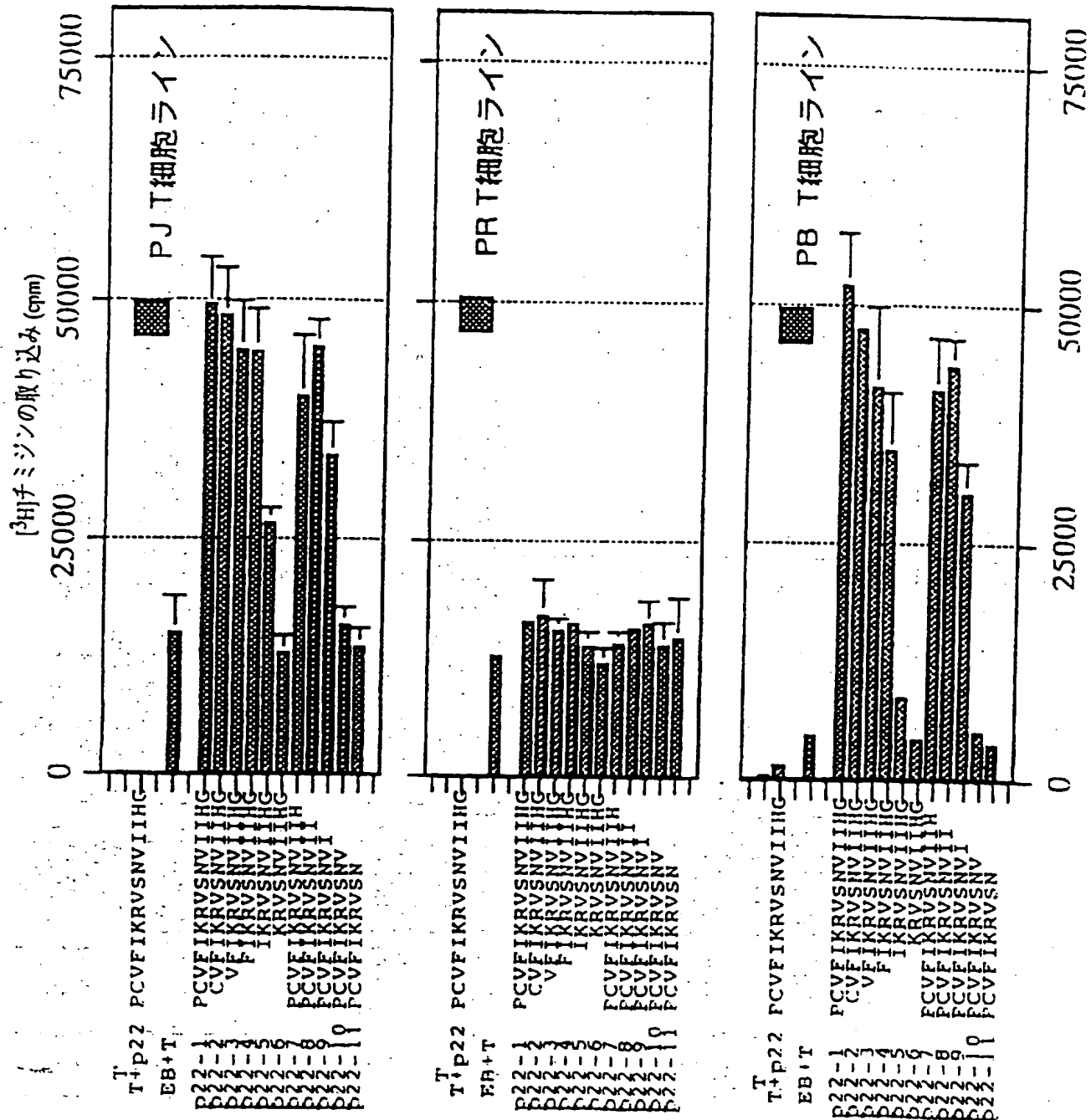


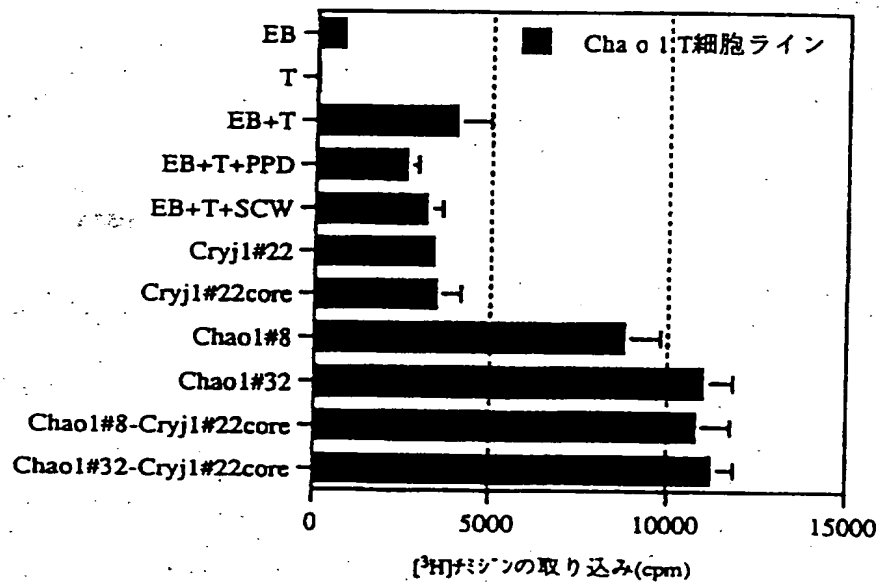
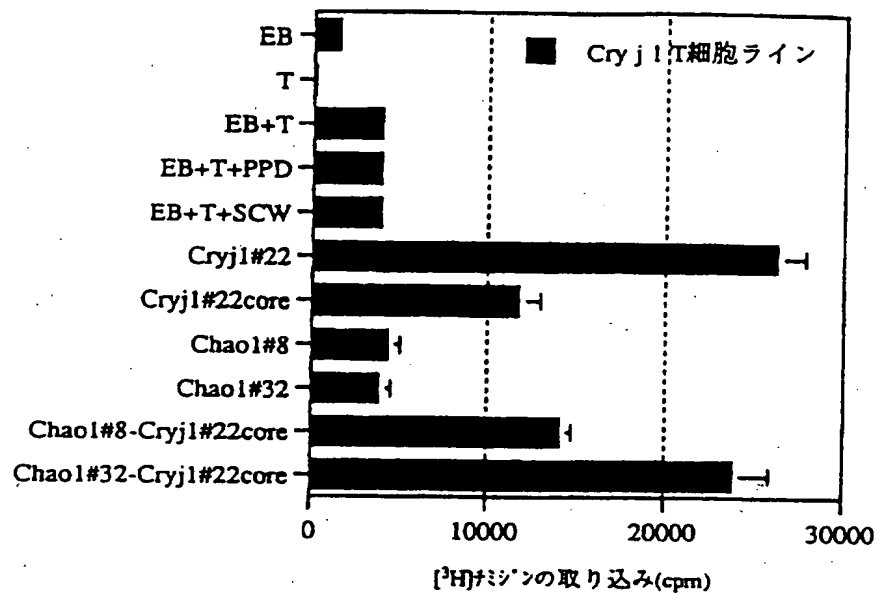
図 15 続き

T細胞ライン



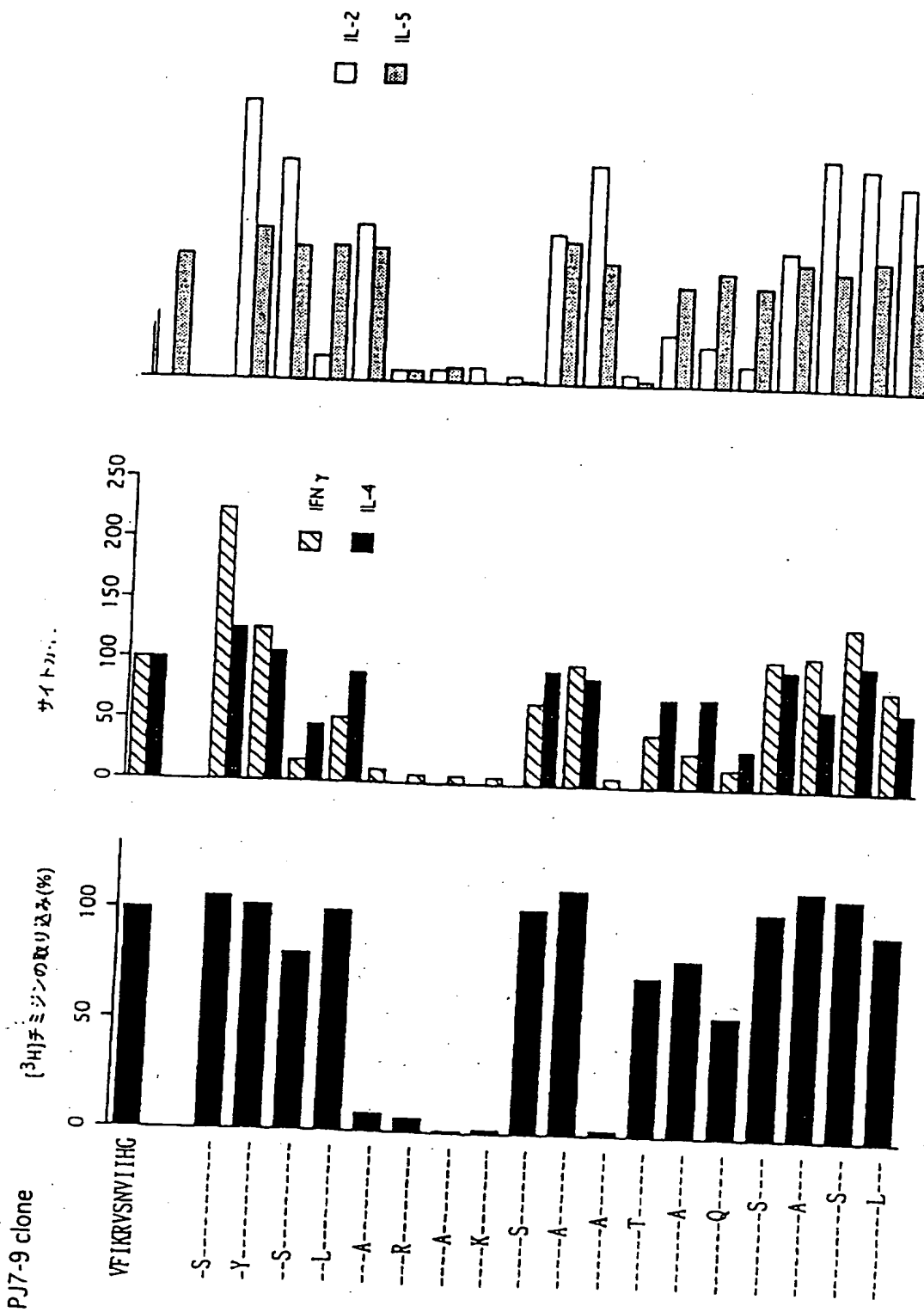
16/18

図 16



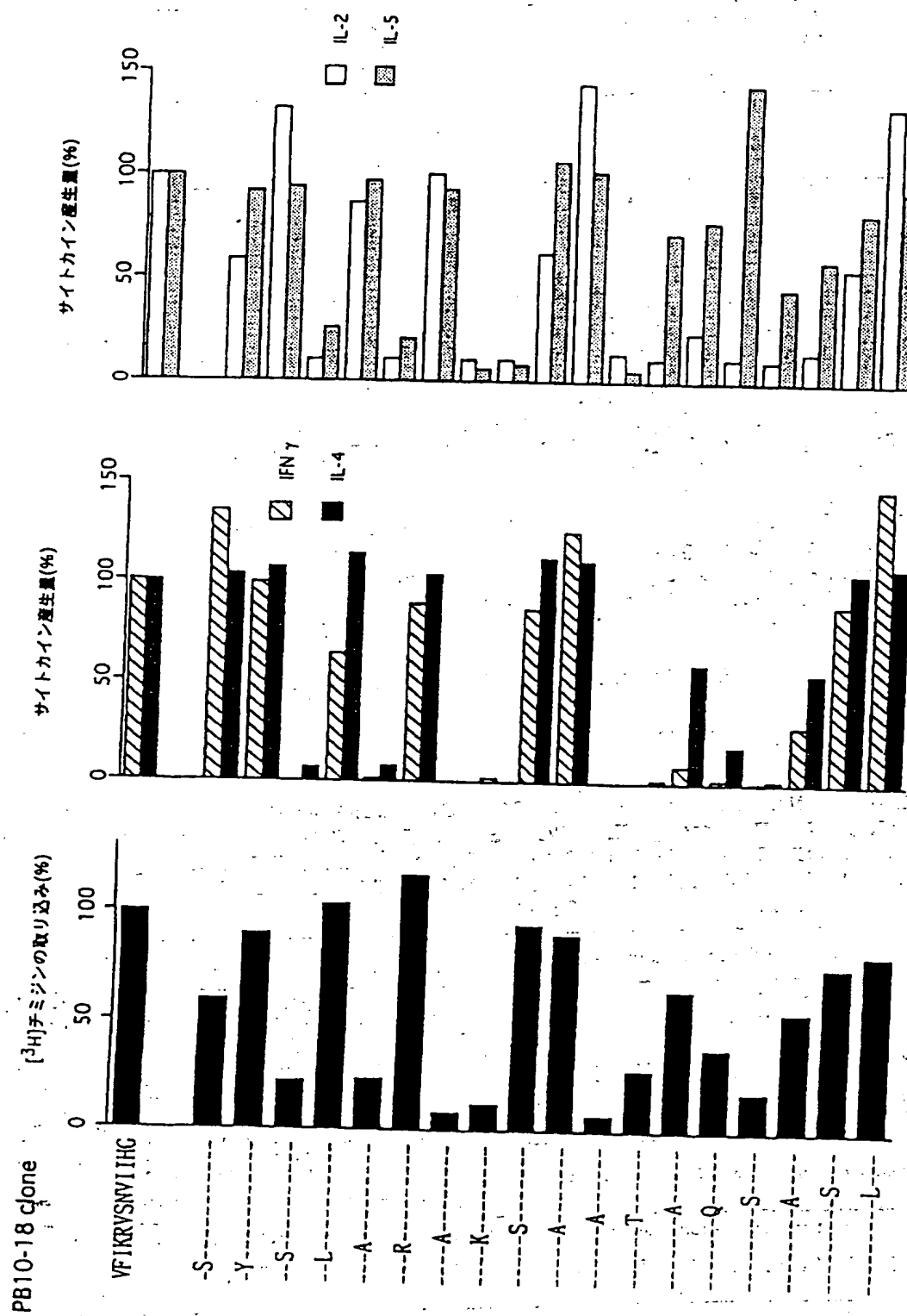
17/18

図 17



18 / 18

図 18



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K39/35 // C07K14/725

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K39/35 // C07K14/725

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y A | ROGERS, Bruce L. et al. "POTENTIAL THERAPEUTIC RECOMBINANT PROTEINS COMPRISED OF PEPTIDES CONTAINING RECOMBINED T CELL EPITOPE", Molecular Immunology, 1994, Vol. 31, No. 13, pp. 955-966 | 1-4, 6, 7 5, 8, 9 |
| Y A | HIGINS, Julie A. et al., "Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of Dermatophagoides species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules", J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 1994, Vol. 93, No. 5, pp. 891-899 | 1-4, 6, 7 5, 8, 9 |
| Y A | WO, 94/01560, A (Immologic Pharmaceutical Corp.), January 20, 1994 (20. 01. 94) & EP, 659214, A | 1-4, 6, 7 5, 8, 9 |
| Y A | KOMIYAMA, Naoki et al., "cDNA CLONING AND EXPRESSION OF Cry j II, THE SECOND MAJOR ALLERGEN OF JAPANESE CEDER POLLEN", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1994, Vol. 201, No. 2, pp. 1021-1028 | 1-4, 6, 7 5, 8, 9 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 22, 1997 (22. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

June 3, 1997 (03. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ A61K39/35 // C07K14/725

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ A61K39/35 // C07K14/725

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|----------------------|
| Y A | ROGERS, Bruce L. et al, "POTENTIAL THERAPEUTIC RECOMBINANT PROTEINS COMPRISED OF PEPTIDES CONTAINING RECOMBINED T CELL EPITOPE". Molecular Immunology, 1994, Vol. 31, No. 13, pp. 955-966 | 1-4, 6, 7 5, 8, 9 |
| Y A | HIGINS, Julie A. et al, "Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of Dermatophagoides species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules", J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 1994, Vol. 93, No. 5, pp. 891-899 | 1-4, 6, 7 5, 8, 9 |
| Y A | WO, 94/01560, A (Immologic Pharmaceutical Corporation) 20.01.94&EP, 659214, A | 1-4, 6, 7 5, 8, 9 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.05.97

国際調査報告の発送日

03.06.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝原 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3453

C (続き) . 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y A | KOMIYAMA, Naoki et al, "cDNA CLONING AND EXPRESSION OF Cry J II, THE SECOND MAJOR ALLERGEN OF JAPANESE CEDER POLLEN", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEACH COMMUNICATIONS, 1994, Vol. 201, No. 2, pp. 1021-1028 | 1-4、6、7 5、8、9 |
| A | MATSUNAGA, Youichi et al., "Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II", FEBS LETTERS, 1993, Vol. 324, No. 3, pp. 325-330 | 5 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)